FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1963 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR

Georges OLIVE

né le 2 février 1931, à Paris 16è

Présentée et soutenue publiquement le :

ACTION NEUROMUSCULAIRE DE QUELQUES ESTERS D'ORTHO-, DE PYRO-ET D'HYPOPHOSPHORAMIDES

Président : Mr. J. CHEYMOL, Professeur

Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris

EDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE - PARIS-V

1-2-1962

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Debré (R.), Fey (B.), Gastinel (P.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D), Quénu (J.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN . . . . . Léon BINET.
Membre de l'Institut

1er ASSESSEUR . . . . . Jean VERNE
2e ASSESSEUR . . . . . Gaston CORDIER

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.) SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	N...
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	PIEDELIÈVRE (R.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	HUGUIER (J.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	BINET (L.) BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)
Physique médicale	DOGNON (A.) DJOURNO (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	N...
Thérapeutique	CONTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale	DESGREZ (P.) POLONOVSKI (J.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Hygiène et médecine préventive	DEPARIS (M.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
Pharmacologie	LÉVY (Mlle J.)
Physiologie	PARROT (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

		MM.
Clinique cancinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)		MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Pitié	CORDIER (G.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades)		FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		GAUDART d'ALLAINES (F. de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)		MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)		LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)		FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)		CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)		HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Boucicaut	LENÈGRE (J.)
	Broussais	SOULIÉ (P.)
	Cochin	JUSTIN-BESANÇON (L.)
	Cochin	BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
	Lariboisière	SÈZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)		DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)		GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)		DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)		DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)		GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales	Baudelocque	LACOMME (M.)
	Foch (Suresnes)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)		VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)		RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)		AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)		LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)		MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)		BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)		MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)		COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)		DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)		ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)		LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique		GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique		PADOVANI (P.)
Séméiologie médicale		DOMART (A.)
Séméiologie et clinique chirurgicales		POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker)		COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)		TURPIN (R.)

b) Professeurs à titre personnel :

Médecine	BOUR (H.) LHERMITTE (F.) PEQUIGNOT (H.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAITRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

	MM.
Anatomie	CABROL (C.) COUINAUD (C.) GILLOT (C.) OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) pr. s. ch. ABELANET (R.) BUSSER (F.) CHOMETTE (G.) COUYGOU (Ch.), m. conf. NEZELOFF (Ch.) ORCEL (L.) PAILLAS (J.)
Anesthésiologie	KERN (E.) VOURC'H (G.)
Bactériologie	BARBIER (P.) CHRISTOL (D.) LE MINOR (L.) TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	BADILLET (E.), m. conf. BOURILLON (R.) CARTIER (P.) DREYFUS (J.-Cl.) GONNARD (P.) KRUH (J.) JEROME (H.)
Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports	PLAS (F.)
Carcinologie	BOIRON (M.) DENOIX (P.) MATHE (G.) SELIGMANN (M.)
Dermato-Syphiligraphie	CIVATTE (J.) DUPERRAT (B.)
Electro-Radiologie	LEDOUX-LEBARD (G.)
Hématologie	BESSIS (M.) BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.) DUHAMEL (G.)
Histologie	COUJARD (R.), pr. s. ch. MAROIS (M.) RACADOT (J.)
Hydrologie	BESANÇON (F.) CORNET (A.)
Hygiène	BOYER (J.) pr. s. ch. BLANCHER (G.) CORRE-HURST (Mme L.) SAPIN-JALOUSTRE (H.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.) DUPONT (V.)
Médecine légale	BERGERET (L.), pr. s. ch. FOURNIER (E.) GUENIOT (M.) HADENGUE (A.)
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Neuro-chirurgie	PERTUISET (B.)
Obstétrique	GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) LEVY (J.) MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) SENEZE (J.) SUREAU (C.) THOYER-ROZAT (J.)
Ophtalmologie	BRÉGEAT (P.) DUBOIS (A.) SARAUX (H.)

	MM.
Orthopédie	JUDET (R.) MEARY (R.) POSTEL (M.) RAMADIER (J.)
Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.) PIALOUX (P.)
Parasitologie	GOLVAN (Y.) LAPIERRE (J.)
Pathologie chirurgicale	BARCAT (J.) BINET (J.-P.) CAUCHOIX (J.) CERBONNET (G.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUBOST (Cl.) FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GARSAY (M.) GARNIER (H.) (Cl. de) GAUDART-d'ALLAINES GERMAIN (A.) LATASTE (J.) LEVEQUE (B.) LOYGUE (J.) MERCADIER (M.) NATALI (J.) PELLERIN (D.) PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale	BENHAMOU (J.-P.) BERTHAUX (P.) BOIVIN (P.) CROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LŒPER (J.) MAURICE (J.) MIKOL (Cl.) RIGHET (G.)
Pathologie médicale	AUSSANNAIRE (M.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRICAIRE (H.) BRISSAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CATINAT (J.) CHRÉTIEN (J.) COBLENTZ (B.) CONTAMIN (F.) COURY (C.) ÉTIENNE (J.-P.) FREZAL (J.) FRITEL (D.) HENNEQUET (A.) HIMBERT (J.) HOUSSET (E.) LAROCHE (Cl.) LESOBRE (R.) MACREZ (C.) MOREAU (L.) NICK (J.) ROYER (P.) TOURNEUR (R.) WOLFROMM (R.)
Pédiatrie-Puériculture	JOSEPH (R.) LAFOURCADE (J.) LEPERCQ (G.) MANDE (R.) MOZZICONACCI (P.) POLONOVSKI (C.) ROSSIER (A.) VIALATTE (J.)

	MM.
Pharmacologie	BOISSIER (J.) LECHAT (P.)
Physiologie	BARRES (G.) DEJOURS (P.) DURAND (J.) GIRARD m. conf. HUGELIN (A.) SCHERRER (J.)
Physique médicale	CHANTEUR (J.) GOUGEROT (L.), m. conf. pr. s. ch. GREMY (F.) m. conf. MILHAUD (G.) PELLERIN (P.) ROUCAYROL (J.-Cl) TUBIANA (M.) m. conf.
Pneumo phtisiologie	KREIS (B.) MEYER (A.) RENAULT (P.)

	MM.
Psychiatrie	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	DENIKER (P.) DUCHE (D.) FLAVIGNY (H.) LAPRESLE (J.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)
Stomatologie	CERNEA (P.) CHAPUT (Mme A.) m. c. agr. GRELLET (M.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) LAMOTTE (M.) MARCHE (J.)
Urologie	AUVERT (J.) MOULONGUET (A. QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.
Anatomie	DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale	ABOULKER (P.) AMFLINE (A), pr. s. ch. VERNE (J.-M.)
Clinique médicale	PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.) MAYER (M.)

	MM.
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.) OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	MADURO (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie . . . . . HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.

Pathologie chirurgicale . . . . . RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V. - CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

BOLTANSKI (E.)
LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté . . . . . M. LENA (J.)

Secrétaire principal . . . . . Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine . . . . . M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateur . . . . . Mlle DUMAITRE (P.)

Bibliothécaires . . . . . Mmes CONTET (J.), FORGET (F.),
Mlles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Je remercie les organiciens qui m'ont confié les substances étudiées, et les pharmacologues qui m'ont aidé de leurs conseils.

Ce travail s'insère dans l'oeuvre collective de l'Institut de Pharmacologie, oeuvre à laquelle nous sommes heureux d'apporter une modeste contribution.

A Mon Père

Pharmacien,
Diplomé des Hautes Etudes Commerciales,
Licencié en Droit

A Ma Mère

A Ma Femme

A tous les Miens

En témoignage de ma profonde affection.

A mes Amis

Claude PECHERY et Charles MAZZONI

En gage d'une profonde amitié

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40152014_0026

A Monsieur le Professeur Jean CHEYMOL

Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Officier de la Légion d'Honneur,

En témoignage de la bienveillance paternelle avec laquelle il nous a accueilli dans son laboratoire, de la sollicitude avec laquelle il nous a conseillé au cours de ce travail, et de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Doyen G. VALETTE

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'Honneur

Ses conseils éclairés et bienveillants furent l'élément déterminant de notre vocation.

Il nous a constamment aidé à la réaliser, par les encouragements et l'appui qu'il n'a jamais cessé de nous prodiguer

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très vive et très respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé P. LECHAT

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

"Hommages respectueux"

A Monsieur le Professeur Agrégé J.R. BOISSIER

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

"Hommages respectueux".

A Monsieur le Professeur MERLE D'AUBIGNE

Professeur de Clinique Chirurgicale, Orthopédique et Réparatrice
à la Faculté de Médecine de Paris,
Chirurgien à l'Hôpital Cochin
Membre de l'Académie de Chirurgie,
Officier de la Légion d'Honneur

Avec l'expression de notre très respectueuse gratitude pour la confiance qu'il nous a témoignée en nous accueillant dans son Service à l'Hôpital Cochin.

A Monsieur le Professeur J. DELGA

Pharmacien Colonel
Professeur Agrégé du Val-de-Grâce,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

En témoignage de reconnaissance pour les deux années de travail que nous avons passées dans son Service et pour la sympathique compréhension qu'il a toujours manifestée à notre égard.

L'amitié et l'esprit d'équipe qui règnent dans l'Institut de Pharmacologie m'ont rendu ce travail agréable et aisé.

ABREVIATIONS, NONS COMMUNS, NOMS CHIMIQUES et NOMS DEPOSES (*), UTILISES DANS CETTE THESE

Décamethonium = iodure de décamethonium - Syncurine (*)

D.F.P. = diisopropylfluorophosphate

Edrophonium= Metahydroxyphenyldimethylethylammonium - Tensilon (*)

Isopropylparaoxon = diisopropylparanitrophenylphosphate.

Mebubarbital = Nembutal (*)

Methylparaoxon = dimethylparanitrophenylphosphate.

Paraoxon = dietylparanitrophenylphosphate

Pralidoxime (iodure de) = iodoMethylate de l' α-PyridylAldoxime

Pralidoxime (méthylsulfate de) = methylsulfate de l'α-pyridylaldoxime ou 7676 RP - Contrathion (*)

Sarin = monoisopropylmethylfluorophosphate

Tabun = monoethyldimethylaminocyanophosphate

T.E.P.P. = tetraethylpyrophosphate.

oOo

INTRODUCTION

L'étude des composés organophosphorés a débuté en France, il y a plus d'un siècle, par la synthèse du tétraéthylpyrophosphate (T.E.P.P.) préparé dans le laboratoire de WURTZ, Professeur de Chimie et de Pharmacie à la Faculté de Médecine de Paris.

Mais, c'est la synthèse par LANGE et KRUEGER, en 1932, des esters méthyl- et éthylfluorophosphoriques qui peut être considérée comme le point de départ des importantes recherches modernes sur ces composés.

Les travaux de SCHRADER, en Allemagne (1935) et de Mc. CUMBIE et SAUNDERS, en Angleterre (1941) illustrent le développement rapide de cette chimie, stimulé par l'utilisation des dérivés organophosphorés comme insecticides et surtout par la possibilité de leur emploi comme toxiques de guerre.

A l'heure actuelle, on évalue à 1 ou 2 par jour le nombre de ces composés nouveaux synthétisés.

La formule générale de ces dérivés organophosphorés a été donnée dès 1937 par SCHRADER :

- R_1 et R_2 peuvent être des radicaux : alkyl, alkoxy, alkamine, mercaptan, etc...

- X qui peut être un résidu organique : paranitrophénol, etc... ou inorganique

ganique : fluor, chlore, phosphate, cyanure, etc...

On voit ainsi que la chimie de ces dérivés est capable d'une variation presque infinie.

Le but de ce travail est l'étude de quelques-uns de ces dérivés et de leur action au niveau de la jonction neuromusculaire.

Le plan adopté pour ce travail est le suivant :

I - ETUDE CHIMIQUE

II - ETUDE PHARMACOLOGIQUE

1 - GENERALITES

2 - METHODES EXPERIMENTALES

3 - RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - TOXICITE AIGUE

II - ACTION NEUROMUSCULAIRE

CONCLUSIONS

oOo

CHAPITRE I

ETUDE CHIMIQUE

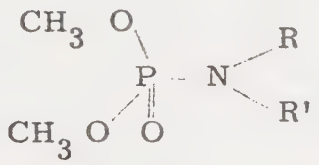
Depuis plusieurs années, de nombreux travaux sur les dérivés organophorés ont été entrepris à l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris, sous la direction de Monsieur le Professeur J. CHEYMOL [12, 14, 16 à 25, 42, 52].

Les dérivés organophosphorés dont nous étudierons l'action neuromusculaire, appartiennent à trois séries différentes :

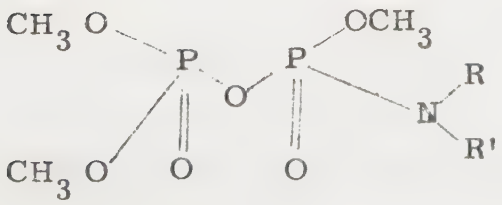
- la première série comprend des esters diméthyl de phosphoramides (I)

- la deuxième série se subdivise en deux groupes : les esters triméthyl de pyrophosphoramides (II) et les esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III)

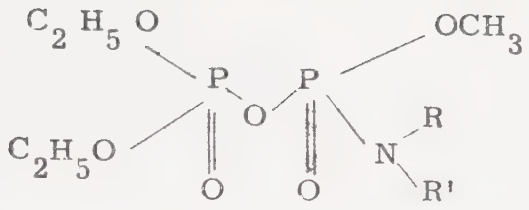
- la troisième série enfin contient des esters monométhyldiéthyl d'hypophosphoramides (IV)



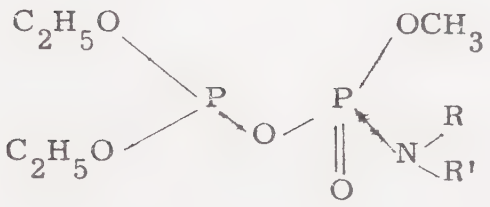
(I)



(II)



(III)



(IV)

Dans chacune de ces séries, le radical aminé varie systématiquement. Ceux-ci dérivent des amines secondaires suivantes :

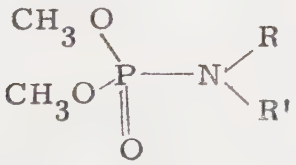
Diméthylamine = $HN(CH_3)_2$

Diéthylamine = $HN(C_2H_5)_2$

Morpholine =

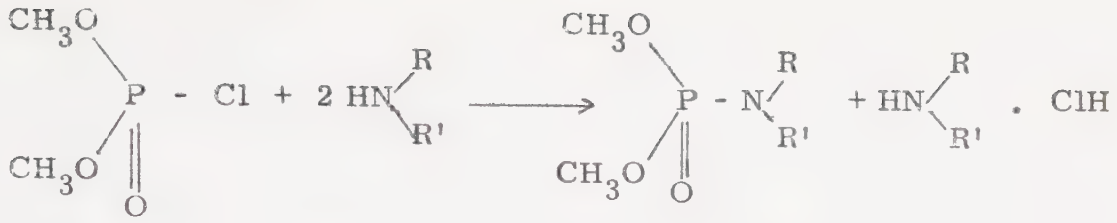
Pipéridine =

A - <u>DIESTERS METHYLIQUES DE PHOSPHORAMIDES (I) [23, 16]</u>



(I)

Ces substances (I) se préparent par action d'une molécule de chlorure de l'acide diméthylphosphorique (V) sur deux molécules de l'amine secondaire choisie (VI) en milieu éthéré anhydre selon <u>l'équation A</u> :



(V) (VI) (I)

Ces formules et les constantes physiques de ces dérivés sont rassemblées sur le Tableau 1 .

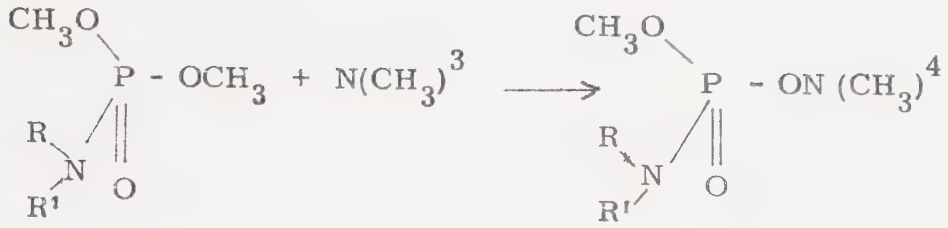
Numéros Conventionnels de l'Institut	CH_3O / CH_3O P - N (R, R) (I) — $-N(R,R')$	E(°C/mm)	ηD^{25}	Chaleur d'activation Qcal/mol.
1715 HC	$-N(CH_3)_2$	78/79/15	1,4175	10,020
1717 HC	- N	96/1	1,4530	11,800
1718 HC	- N	119/15	1,4528	10,200

TABLEAU 1

B - TRIESTERS DE PYROPHOSPHORAMIDES (II et III) et D'HYPOPHOSPHORAMIDES (IV)

La préparation de ces dérivés repose sur une réaction générale commune aux diesters de phosphoramides possédant au moins un radical "méthyl" [23].

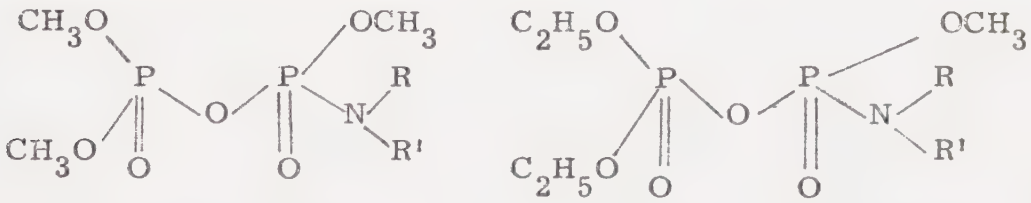
Ces composés (I) réagissent aisément en milieu organique anhydre sur la triméthylamine selon l'équation B pour conduire à un sel de tétraméthylammonium (VIII)



(I) (VIII)

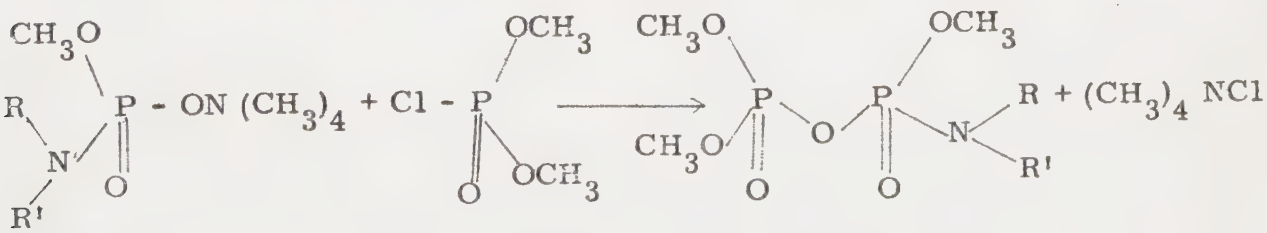
Cette réaction permet d'envisager la synthèse de nouvelles séries dérivées des acides pyrophosphorique et hypophosphorique.

1 - Triesters de pyrophosphoramides (II et III) [19]



(II) (III)

La préparation consiste à faire réagir un chlorure d'acide phosphorique disubstitué (XI) sur l'ester diméthyl ou diéthyl d'un amidophosphate de tétraméthylammonium (VIII) selon l'équation C :



(VIII) (XI) (II)

Les dérivés dont nous avons étudié les propriétés neuromusculaires appartiennent à deux séries différentes :

- la série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II)

- la série des esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III)

Les formules et constantes physiques sont indiquées sur le tableau 2

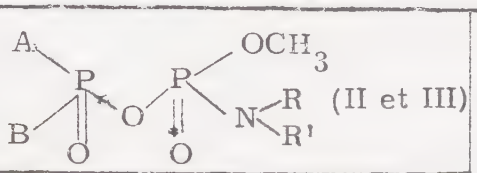
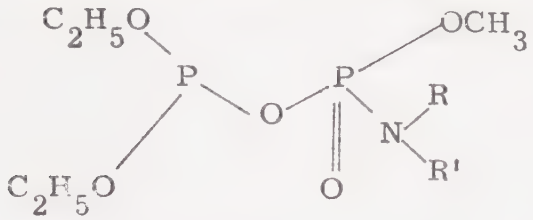
Numéros conventionnels de l'Institut	 (II et III)		E (°C/mm)
	A = B	$-N\begin{matrix}R\\R'\end{matrix}$	
4030 HC	$-OCH_3$	$-N(CH_3)_2$	115/0,1
4031 HC	$-OCH_3$	$-N(C_2H_5)_2$	112/0,02
4032 HC	$-OCH_3$		110/0,03
4033 HC	$-OCH_3$		115/0,05
4034 HC	$-OC_2H_5$	$-N(CH_3)_2$	110/0,1
4035 HC	$-OC_2H_5$	$-N(C_2H_5)_2$	112/0,01
4037 HC	$-OC_2H_5$		112/0,01
4036 HC	$-OC_2H_5$		116/0,01

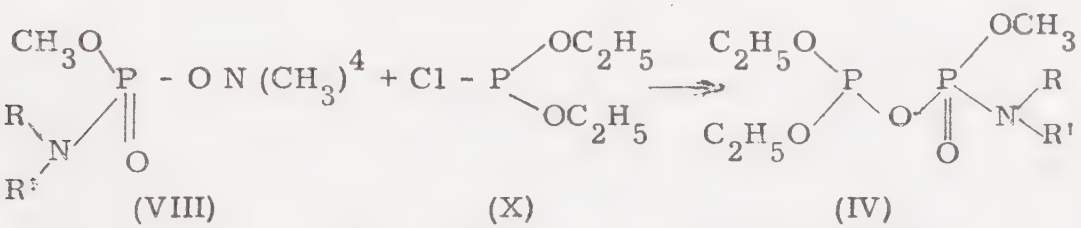
TABLEAU n° 2

2 - Triesters d'hypophosphoramides (IV) [20]



(IV)

La préparation de ces composés consiste à faire réagir, en milieu anhydre, le chlorure d'un acide phosphoreux disubstitué (diéthyl)(X) sur l'ester méthyl d'un amidophosphate de tétraméthylammonium (VIII) selon l'équation D :



(VIII) (X) (IV)

Les formules et constantes physiques des corps dont nous étudierons les propriétés neuromusculaires sont réunies dans le tableau 3

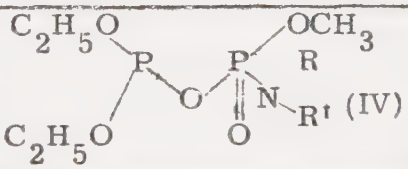
Numéros conventionnels de l'institut	 (IV)	E/°C/mm
4130 HC	$-N(CH_3)_2$	101/0,04
4131 HC	$-N(C_2H_5)_2$	104/0,01
4132 HC		121/0,01
4133 HC		112/0,01

TABLEAU n° 3

CHAPITRE II

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

I. - GENERALITES

II. - METHODES EXPERIMENTALES

III. - RESULTATS EXPERIMENTAUX

oOo

- 1 -

GENERALITES

I - REACTIONS BIOCHIMIQUES DES CHOLINESTERASES

A - MECANISME D'ACTION DES CHOLINESTERASES

Pour expliquer l'hydrolyse enzymatique de l'acétylcholine par les cholinestérases, NACHMANSOHN et WILSON [40] suggèrent le mécanisme de réaction suivant :

$$EH + AcCh \xrightarrow{(1)} (EH.... AcCh) \xrightarrow{(2)} ChOH + EAc \xrightarrow{(3)} EH + AcOH + OH_2$$

EH = Enzyme AcCh = acétylcholine EAc = enzyme acétylé

ChOH = choline AcOH = acide acétique

1) La réaction 1

aboutit à la formation d'un complexe (EH ..... AcCh) dont la stabilité est assurée par des forces qui unissent le substrat (AcCh) à la surface de l'enzyme (EH)(fig. 1)

- lien ionique entre l'azote quaternaire du substrat et un site anionique de l'enzyme;
- un lien covalent entre le carbone du carboxyle du substrat et un site estérasique de l'enzyme;
- enfin, on fait intervenir les forces d'attraction de Van der WAALS.

2) La réaction 2

conduit à la formation de choline (ChOH) et d'un enzyme acétylé (EAc) dont la réactivité est très grande.

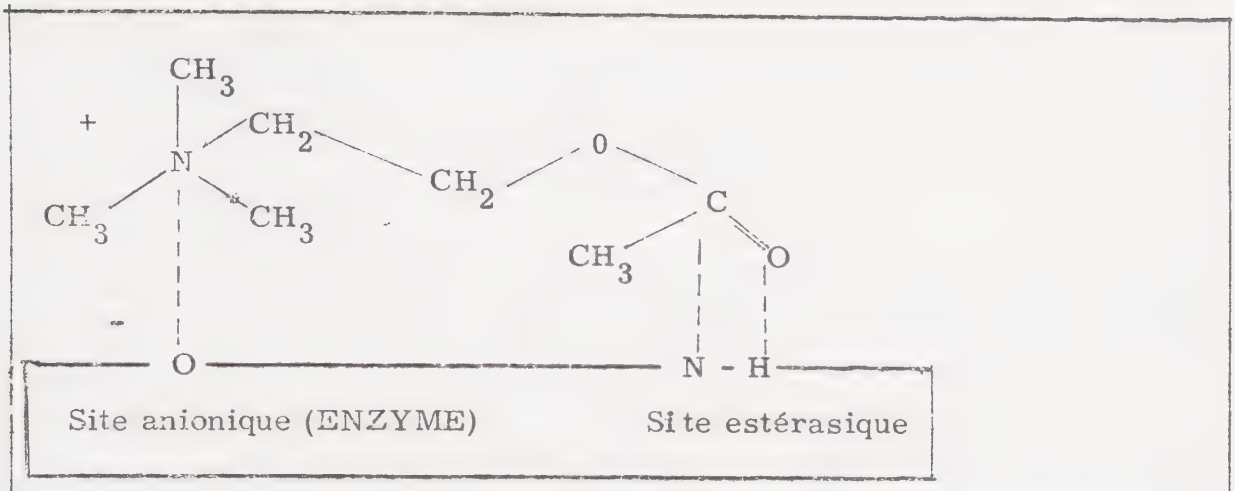


Fig. 1 = Schéma représentant les forces qui unissent l'acétylcholine (AcCh) à la surface de l'enzyme)

3) La réaction 3 :

grâce à la fixation d'une molécule d'eau régénère l'enzyme et donne une molécule d'acide acétique.

B - BLOCAGE DE LA CHOLINESTERASE PAR LES INHIBITEURS ORGANO-PHOSPHORES

La cinétique d'inhibition des cholinestérases par les organo phosphorés peut être représentée par la réaction suivante :

$$EH + IX \xrightarrow{(1)} (EH \ldots IX) \xrightarrow{(2)} XH + (E \ldots I) \xrightarrow[+ OH_2]{Re\ (3)} EH + IOH + XH$$

EH = enzyme IX = inhibiteur à groupe labile X

(EH..... IX) = complexe hypothétique primaire entre l'inhibiteur et l'enzyme.

$(E \ldots I)^{Re}$ = enzyme inhibé, plus ou moins facilement réactivable.

XH, IOH = produits d'hydrolyse de l'inhibiteur ou du substrat.

Ces réactions sont du même type que celles de l'hydrolyse enzymatique de l'acétylcholine par la cholinestérase, mais elle en diffèrent par les vitesses et les points d'équilibre :

1) La réaction 1

dépend des propriétés de liaison de la molécule d'inhibiteur (c'est la seule qui se produise avec les inhibiteurs réversibles type ésérine).

2) La réaction 2 :

conduit, grâce à un processus de phosphorylation du centre actif de l'enzyme (site estérasique) à la formation d'un enzyme phosphorylé dont la réactivité est faible ou nulle (fig. 2)

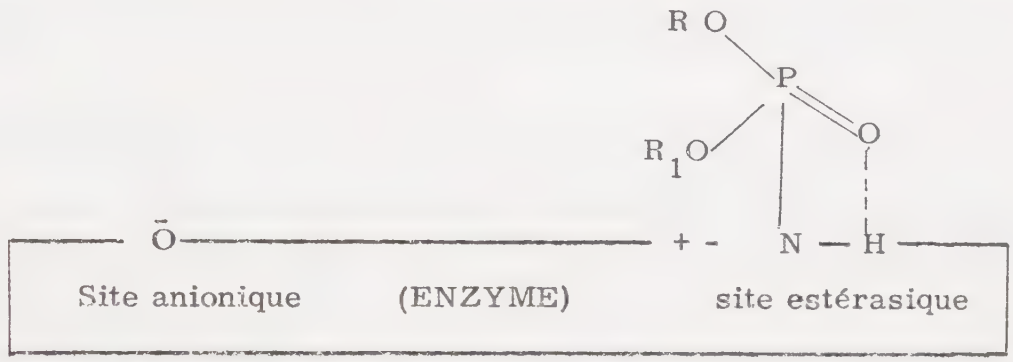


Fig. 2 : schéma représentant l'enzyme - D F P phosphorylé

La vitesse de cette réaction dépendra de la labilité de la liaison entre le radical phosphoryl et le groupe labile (X), donc de la structure d'ensemble de la molécule d'inhibiteur . Si l'enzyme est inhibé par des inhibiteurs organophosphorés qui ne diffèrent que par leur radical labile (X) mais qui ont deux autres radicaux en commun, il y a dans tous les cas formation du même enzyme phosphorylé.

3) La vitesse de la réaction 3 :

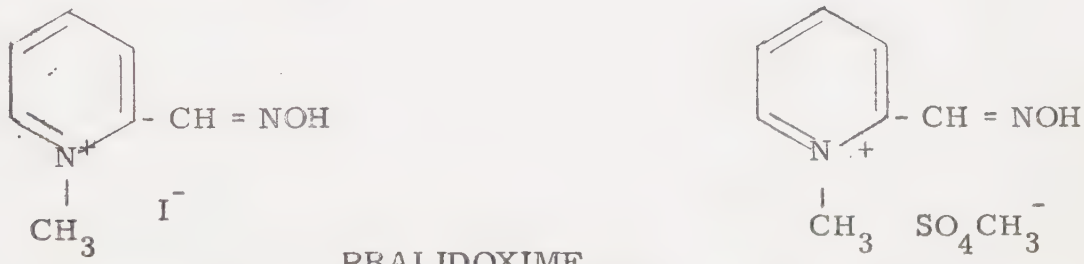
ou vitesse de réactivation de l'enzyme dépendra de la stabilité de l'enzyme phosphorylé, donc, en première approximation, de la structure du radical phosphorylant l'enzyme. BURGEN et HOBBIGER (1951) [11] ont montré que, plus le radical dialkylphosphate est grand et ramifié, plus la réversibilité de l'inhibition est difficile. Ils concluaient que la qualité d'inhibiteurs "irréversibles" de la cholinestérase qui caractérise les dérivés organophosphorés est inexacte puisque l'on trouve, dans ce groupe, des produits dont l'activité va de la simple

formation d'un complexe par action compétitive (diméthylphosphostigmine) jusqu'à celle d'un enzyme phosphorylé dont la stabilité est telle que la vitesse de réactivation de l'enzyme in vivo dépend du temps de resynthèse de l'enzyme (DFP et diisopropylfluorostigmine).

La découverte par WILSON et coll. (1955) de la propriété des dérivés à fonction oxime, de réactiver les cholinestérases bloquées par les organophosphorés, a permis de réviser la notion selon laquelle les complexes formés par ces substances avec la cholinestérase étaient irréversibles. On admet actuellement que ces complexes sont seulement difficilement réversibles.

B - REACTIVATEURS DE LA CHOLINESTERASE

Les produits à fonction oxime sont capables de réactiver in vivo et in vitro les cholinestérases bloquées par phosphorylation; tel, par exemple, les dérivés de la Pralidoxime :



PRALIDOXIME

iodure de — méthylsulfate de

(méthyl 1 N hydroxyiminométhyl 2 pyridinium)

Le mécanisme de la réactivation est simple ; avec l'hydroxylamine agissant sur l'enzyme phosphorylé, il y a régénération de l'enzyme et du dérivé azoté libérateur (WILSON) (fig. 3)

$$EI + NH_2OH \longrightarrow EH + INHOH$$

EI = enzyme inhibé difficilement réversible,

EH = enzyme réactivé .

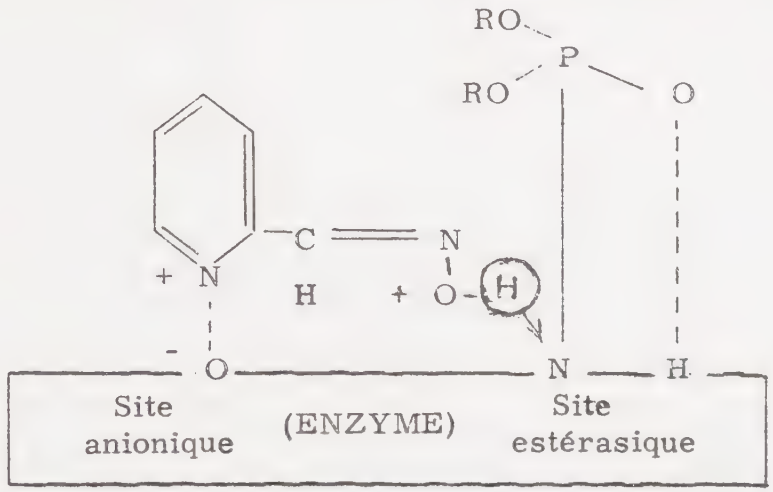


Fig. 3 : Schéma de la réactivation d'une cholinestérase bloquée par un organophosphoré (WILSON, 1959) 53

II - MECANISME D'ACTION DES ANTICHOLINESTERASIQUES ORGANOPHOSPHORES A LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

Depuis une dizaine d'années, un grand nombre de mises au point sont parues sur l'action neuromusculaire des anticholinestérasiques; parmi les plus intéressantes, nous citerons celles de KOELLE et GILMAN (1949) [41] HUNT et KUFFLER (1950) [38] RIKER (1953) [48], DELGA (1957) [32], HOLMSTEDT (1959) [36] et JACOB et TAZIEFF-DEPIERRE (1959) [39].

A - ETUDE THEORIQUE : CHOLINESTERASE ET TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRE DE L'INFLUX NERVEUX

Avant de parler du mécanisme d'action des anticholinestérasiques à la jonction neuromusculaire, il est nécessaire de résumer très succintement l'état de nos connaissances sur le rôle joué par la cholinestérase dans la transmission de l'influx nerveux du nerf au muscle.

1 - Cholinestérase dans le muscle strié

Le muscle strié contient 95/100 d'acétylcholinestérase ou cholinestérase vraie et 5/100 de butylcholinestérase ou pseudo-cholinestérase.

Les techniques histochimiques (méthode de KOELLE) ont révélé que la cholinestérase, en particulier l'acétyl-cholinestérase, se trouve localisée au niveau des plaques terminales motrices, et en particulier dans sa partie postsynaptique ou appareil sous-neural. La structure fine de l'appareil sous-neural a été révélée par les travaux de COUTEAUX (1958) [29] qui a décrit

un schéma de la plaque motrice :

La fibre nerveuse perd sa gaine de myéline en arrivant au contact du muscle et se ramifie à la surface de la fibre musculaire; chaque ramification se loge dans une gouttière synaptique formée par le sarcoplasme de la fibre. Ce sillon est constitué de lamelles empilées paralliélement les unes aux autres et perpendiculairement par rapport à l'axe de la gouttière. Ces lamelles sont en réalité des replis de la membrane sarcoplasmique, et c'est dans l'intimité de cette structure que se trouve concentrée la cholinestérase. Entre la terminaison nerveuse et l'appareil sous-neural, existe un intervalle où s'effectue la transmission synaptique neuromusculaire dont le transmetteur a été identifié à l'acétylcholine.

Grâce au microscope électronique, on a mis en évidence dans l'axoplasme terminal un grand nombre de vésicules dont le diamètre est relativement constant (de 30 à 50 mμ) et qui n'existent pas dans le reste de l'axone moteur. Ces vésicules renfermeraient l'acétylcholine sous une forme inactive. Chacune de ces vésicules peut être considérée comme une unité multimoléculaire renfermant un "quantum" de transmetteur.

2 - Rôle de la cholinestérase dans la transmission de l'influx nerveux au niveau de la plaque motrice.

Notre conception actuelle des phénomènes qui se succèdent au niveau de la plaque motrice lors de la transmission de l'influx nerveux peut être résumée comme suit :

L'arrivée des potentiels d'action du nerf, à la terminaison de l'axone préganglionnaire, libère l'acétylcholine d'un site de stockage intra-axonal.

L'acétylcholine diffuse à travers l'intervalle synaptique, se combine avec les neuro-récepteurs de la membrane postsynaptique et entraîne le développement d'une dépolarisation non propagée ou potentiel de plaque. Ce dernier, lorsqu'il atteind un certain seuil, donne naissance àun potentiel propagé : le potentiel d'action du muscle.

La polarisation de la membrane postsynaptique est restaurée grâce à la rapide destruction du transmetteur synaptique par l'acétylcholinestérase.

REMARQUE

Il semble, bien que ce ne soit pas prouvé, que la décharge d'acétylcholine en réponse à un influx nerveux, se produise par la rupture synchronisée d'un certain nombre de vésicules et libère une quantité correspondante de quanta d'acétylcholine qui produit le potentiel de plaque motrice. Même à l'état de repos, un certain nombre de ces vésicules éclatent spontanément et libèrent des quanta d'acétylcholine qui déterminent des potentiels de plaque "miniatures" qui restent bien au-dessous du seuil de la fibre.

3 - Mode d'action des anticholinestérasiques sur la jonction neuromusculaire.

Le mécanisme d'action des anticholinestérasiques est aisé à comprendre l'inhibition de la cholinestérase protège l'acétylcholine de son hydrolyse enzymatique, et son action, normalement éphémère, devient persistante. Les anticholinestérasiques auront donc, exception faite des propriétés particulières dues à la structure chimique de la molécule, les mêmes actions sur la plaque motrice que l'acétylcholine elle-même.

a) - Dans les conditions de repos du nerf, on a observé une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des potentiels miniatures de la plaque terminale, telle que des potentiels d'action propagés peuvent prendre naissance, déterminant des secousses dans les fibres individuelles du muscle (fibrillations) et des contractions des groupes de fibres (fasciculations).

b) - Dans les conditions d'activité du nerf, lorsqu'un influx nerveux atteint la synapse neuromusculaire, on observe une augmentation en amplitude et en durée du potentiel de plaque (Del CASTILLO et KATZ [31], c'est-à-dire une dépolarisation prolongée de la plaque motrice. Si les cholinestérases sont suffisemment inhibées, on observe, selon la fréquence d'excitation, des réponses opposées :

- à basse fréquence (6 à 10 stimuli/min) chaque influx afférent donne naissance à une décharge répétée visible macroscopiquement comme une seconsse tétanique ou comme une augmentation de réponse mécanique du muscle. Ce phénomène résulte de la persistance anormale de l'acétylcholine au niveau de la plaque motrice, mais la diffusion suffit encore à son élimination.

- à haute fréquence de stimulation (fréquence tétanique) l'acétylcholine est libérée à une telle cadence que, la diffusion devenant insuffisante pour son élimination, elle s'accumule et détermine une dépolarisation prolongée de la plaque motrice. Il en résulte un blocage neuromusculaire (inhibition de WEDENSKY).

Les anticholinestérasiques produisent un blocage neuromusculaire par accumulation d'acétylcholine : ils appartiennent donc au groupe des substances dépolarisantes représentées par le groupe des paralysants acétylcholinomimétiques (décaméthonium, succinyldicholine, etc....). Ils sont antagonistes des paralysants curarimimétiques (d - tubocurarine, gallamine, etc....) qui provoquent un blocage compétitif sans changement de potentiel de la membrane de la plaque terminale.

Dans quelle mesure l'étude pharmacologique de l'action des inhibiteurs organophosphorés sur les préparations neuromusculaires s'accorde-t-elle avec les propriétés générales des anticholinestérasiques ? Possèdent-ils d'autres propriétés que celles relatives à l'inhibition de l'enzyme ? C'est ce que nous allons voir par l'examen des travaux qui ont été faits sur cette question.

Cette étude dans la littérature est rendue confuse car elle a été faite sur un grand nombre de prépérations neuromusculaires, aussi bien in vivo qu'in vitro utilisant des inhibiteurs variés de la cholinestérase.

B - FAITS EXPERIMENTAUX

1 - Potentialisation des esters de choline et des sels d'ammonium quaternaire non hydrolysables

a) - Sensibilisation à l'acétylcholine par inhibition à la cholinestérase

La potentialisation des effets de l'acétylcholine par les anticholinestérasiques a été étudiée sur de nombreuses préparations :

BURGEN et coll. (1949)[10], HOBBIGER (1950)[34] et SMITH et coll. (1952)[49] sur le rectus de Grenouille, montrent que la potentialisation de la réponse à l'acétylcholine, par le T.E.P.P. est proportionnelle à son activité inhibitrice in vitro, surtout si la source d'enzyme est le broyat de rectus.

HUNT (1947)[37] trouve que le D.F.P. sensibilise le muscle gastrocnémien du chat, stimulé indirectement à l'injection intra-artérielle d'acétylcholine.

Enfin, BARNES et DUFF (1953)[1] étudient la potentialisation par le paraoxon du pouvoir inhibiteur de l'acétylcholine sur le diaphragme de Rat, stimulé à basse et haute fréquences; cet effet est mis en relation avec les taux de vraie et de pseudo- cholinestérase.

L'action sensibilisante des anticholinestérasiques, vis-à-vis de l'acétylcholine, est facilement explicable dans le cadre de la théorie classique de l'inhibition des cholinestérases. Cependant, certaines recherches font penser qu'un autre mécanisme peut exister et jouer au même titre que le mécanisme classique.

b) - Sensibilisation à l'acétylcholine et aux sels d'ammonium quaternaire par action directe sur le neurorécepteur :

On sait que la néostigmine possède une action sensibilisante indépendante de son pouvoir anticholinestérasique. Il semble que l'on puisse envisager une hypothèse semblable dans le cas des substances organophosphorées

COHEN et POSTHUMUS, sur le rectus de Grenouille (1955)[26] et sur le diaphragme du Rat, stimulé à basse fréquence (1957) [27] montrent que le D.F.P. (0,1 à 100 µg./kg) sensibilise ces préparations à l'effet d'effecteurs variés dont les uns sont facilement hydrolysables : acétylcholine, les autres difficilement hydrolysables : butyrylcholine, succinylcholine, enfin, des produits

entièrement réfractaires à l'attaque estérasique, tel que : décaméthonium, édrophonium et choline.

Van der MEER et MEETER (1956)[44,] sur le diaphragme isolé du Rat dont les cholinestérases ont été totalement inhibées par deux doses successives de D.F.P. (5 µg/ml) trouvent que la sensibilité à l'acétylcholine peut encore être augmentée par une nouvelle dose de D.F.P. (5 µg/ml).

Tous ces auteurs insistent sur le caractère plus ou moins réversible de ces phénomènes, alors même que toute activité cholinestérasique a disparu. Ils concluent à l'existence d'un effet sensibilisateur du D.F.P. par action directe sur la plaque motrice qui interfère sans doute avec l'inhibition de la cholinestérase dans le cas de l'acétylcholine et joue exclusivement dans le cas des produits non hydrolysables : décaméthonium, édrophonium, choline.

Mais il faut remarquer que les doses de D.F.P. utilisées dans ces expériences sont considérablement plus élevées que celles habituellement admises pour une étude pharmacologique.

2 - Action des anticholinestérasiques organophosphorés sur les préparations neuromusculaires stimulées indirectement.

a) - A basse fréquence (6 à 30 stimuli/sec.)

α) Faibles ou moyennes concentrations d'anticholinestérasiques :

La majorité des expériences ont été exécutées sur la préparation nerf phrénique-diaphragme isolée du Rat (Nous préciseront lorsqu'il s'agira d'une autre préparation).

1 - Potentialisation des contractions : les modifications apportées à la réponse musculaire après l'administration d'une dose faible ou moyenne d'un organophosphoré se déroulent selon un schéma qui présente toujours les mêmes accidents :

Les contractions augmentent progressivement, passent par un maximum puis diminuent pour reprendre leur valeur initiale. Les fascicularisations

musculaires apparaissent et disparaissent aux mêmes moments.

Le temps de latence qui précède l'apparition du phénomène, la valeur du maximum, la durée totale d'augmentation des contractions, sont inversement proportionnels aux concentrations de l'inhibiteur.

Les travaux de BARNES et DUFF (1953)[1] sur le paraoxon de Van Der MEER et MEETER (1956)[43] sur le D.F.P., etc... endonnent des preuves suffisantes.

2 - Potentialisation des contractions et cholinestérase musculaire

Les phases successives de la réponse musculaire sont étroitement liées à l'inhibition progressive des cholinestérases musculaires.

BARNES et DUFF (1953)[1] utilisent le paraoxon comme inhibiteur et calculent les valeurs de l'activité cholinestérasique (vraie et pseudo-cholinestérase) à partir des constantes de vitesse d'inhibition des cholinestérases du Rat, pour ce même produit établies par DAVISON (1953)[30]. L'augmentation de la réponse musculaire et les fasciculations apparaissent lorsque l'activité cholinestérasique est réduite de 50/100. Elles disparaissent quand il ne reste plus que 10/100 de l'activité enzymatique initiale.

La détermination manométrique directe de l'activité cholinestérasique do donne des résultats plus précis. Van der MEER et MEETER (1956)[43] et BARSTAD (1960)[5] utilisant le D.F.P. comme inhibiteur, arrivent à des conclusions identiques, la potentialisation des contractions commence lorsqu'il ne reste plus que 30/100 à 20/100 de la cholinestérase initiale, elle atteint son maximum alors que l'activité enzymatique résiduelle est à 10/100 de la normale; enfin, elle est pratiquement nulle lorsque les contractions sont revenues à leur position d'origine.

Ces résultats amènent deux remarques importantes :

- l'activité cholinestérasique mesurée, est une activité globale qui ne préjuge pas de sa répartition histologique. Or, l'inactivation de la choli-

nestérase peut être différente au niveau de la plaque motrice et dans le restant du muscle.

- la faible précision du dosage des cholinestérases ne permet pas de distinguer entre une activité très faible et une activité nulle.

3 - Cholinestérase et transmission neuromusculaire à basse fréquence

Les auteurs précédent s'accordent pour constater que l'activité cholinestérasique est pratiquement nulle lorsque les contractions musculaires sont revenues à leur valeur initiale. D'autres expériences rapportées plus loin montrent la réversibilité du blocage des contractions obtenues avec de fortes doses d'organophosphoré, alors que l'activité anticholinestérasique est apparemment nulle.

Ces résultats suggèrent que la transmission de l'influx nerveux à basse fréquence de stimulation peut avoir lieu sans l'intervention de l'hydrolyse enzymatique de l'acétylcholine.

Les partisans du mécanisme classique prennent argument de la faible précision du dosage des cholinestérases pour admettre que les quantités infimes enzyme non détectables par dosages, sont suffisantes pour assurer la transmissions dans ces conditions.

Pour tourner la difficulté, BARSTAD (1956) [3] tente une interprétation statistique des déterminations d'activité cholinestérasique obtenues sur un grand nombre de préparations traitées dans des conditions identiques. Il réalise un blocage des contractions avec des doses de D.F.P. considérables (200 à 500 µg/ml) capables d'inhiber toute activité cholinestérasique. Un lavage ramène les contractions à leur niveau d'origine. A ce moment, on mesure manométriquement l'activité cholinestérasique du diaphragme.

L'interprétation statistique des résultats montre que l'activité cholinestérasique ne présente aucune déviation significative de l'activité zéro. BARSTAD conclut que la transmission des influx uniques à basse fréquence peut procéder indépendamment des cholinestérases.

Sans doute l'hydrolyse non enzymatique et la diffusion sont-elles suffisantes pour éliminer l'acétylcholine dans ces conditions, sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir le mécanisme classique.

4 - Réversibilité de l'action neuromusculaire des dérivés organophosphorés :

Plus le lien de phosphorylation qui unit le radical phosphoré à l'enzyme est stable, plus la réversibilité de l'action neuromusculaire est difficile à obtenir.

Les résultats des travaux de BARNES et DUFF (1952)[11] et de BARSTAD (1960)[47] confirment parfaitement cette hypothèse. Si le radical phosphorylant l'enzyme porte des chaînes isopropyl (D.F.P., isopropylparaoxon) ou éthyl (T.E.P.P., paraoxon, diéthylfluorophosphate), la stabilité de la combinaison est telle qu'il ne sera pas possible d'obtenir le renouvellement de l'effet potentialisateur même après l'élimination de l'excès du produit par lavage.

Si, au contraire, le radical porte des chaînes méthyl (méthyl paraoxon diméthoxyfluorophosphate), le lien est suffisamment lâche pour que la potentialisation des contractions soit parfaitement reproductible après lavage.

β) - A fortes concentrations d'anticholinestérasiques :

1 - Paralysie des contractions :

La dépression des contractions musculaires, réalisées par stimulation indirecte à basse fréquence, est signalée par de nombreux auteurs, sur de nombreuses préparations :

Sur le gastrosnémien du Chat, HUNT (1947)[37] utilise le D.F.P., ainsi que Mr. NAMARA et MURTHA (1954)[45], (1955)[47] aux doses de 10 à 50 mg/kg. et le T.E.P.P. (2 mg/kg)

Sur la préparation nerf phrénique-diaphragme isolée du Rat, BURGEN et coll. (1949)[10] avec le T.E.P.P. (0,25 µg/ml), BERRY et EVANS (1952)[6]

BARSTAD (1956)[2, 3] et Van Der MEER et MEETER (1956)[44] avec le D.F.P. (5 à 200 μg/ml) montrent que la paralysie des contractions est réversible par lavage, alors que les cholinestérases ne sont pas réactivées.

2 - Mécanisme de la paralysie

La réversabilité du blocage neuromusculaire, alors que l'activité cholinestérasique reste nulle, plaide contre le mécanisme classique d'un blocage par accumulation d'acétylcholine, comme le montre BARSTAD (1956)[3] Ce même auteur établit que la paralysie par le D.F.P. n'est pas, contrairement à celle provoquée par l'acétylcholine, antagonisée par la d-tubocurarine (BARSTAD (1956)[2], il y a, au contraire, synergie, supradditive entre le D.F.P. et la d-tubocurarine (1956)[4]. BARSTAD emet l'hypothèse d'une détérioration fonctionnelle des terminaisons nerveuses présynaptiques en relation peut être avec la solubilité des organophosphorés dans les lipides.

Van Der MEER et MEETER (1956)[44] montrent qu'une dose considérable de D.F.P. (200 μg/ml) qui détermine une réduction des contractions, n'a pas d'effet sur le potentiel d'action du nerf ni sur les chronaxies nerveuses et musculaires, et que la stimulation directe du muscle donne une contraction normale. L'effet du D.F.P. s'exerce bien au niveau de la plaque motrice et est sans doute en relation avec une prolongation de la période réfractaire. Le D.F.P. aurait une action indirecte de sensibilisation de la plaque motrice à l'acétylcholine qui s'accorde avec les résultats trouvés par COHEN et POSTHUMUS (1955)[26] et décrits plus bas.

Au contraire, Mc NAMARA et MURTHA (1954)[45] ont trouvé que la diminution réversible de tension du gastrocnémien du Chat (D.F.P. - T.E.P.P. s'accompagne d'une diminution également réversible des potentiels propagés du nerf et de la contractibilité du muscle dénervé stimulé directement.

La question reste ouverte : il semble hors de doute que dans la paralysie neuromusculaire à basse fréquence le rôle joué par l'inhibition des cholinestérases et l'accumulation d'acétylcholine est minime et que un ou plusieurs mécanismes supplémentaires interviennent et, en particulier, une action direc-

te sur le nerf et le muscle. Il faut enfin remarquer que les doses utilisées pour obtenir la paralysie des contractions à basse fréquence sont telles qu'elles n'offrent plus aucun intérêt pour le pharmacologue.

b) - A haute fréquence (30 à 120 stimuli/sec) inhibition de haute fréquence ou inhibition de WEDENSKY

De nombreux auteurs ont étudié l'action des anticholinestérasiques sur la capacité du muscle strié à soutenir un tétanos et le temps nécessaire pour que le blocage neuromusculaire disparaisse.

Les résultats sont variables selon les préparations auxquelles on s'adresse.

α - Préparation nerf phrénique - diaphragme du Rat

1 - Caractère de l'inhibition de haute fréquence : Un certain nombre de points expérimentaux sont bien précisés :

Pour une concentration déterminée d'un anticholinestérasique, l'inhibition apparaît pour une certaine fréquence de stimulation et devient de plus en plus importante quand cette fréquence s'élève.

BARNES et DUFF (1953) [1] montrent que la paralysie par le paraoxon n'apparaît pas si on traite préventivement le diaphragme par l'acétylcholine, phénomène similaire à la prévention par le substrat d'une inhibition enzymatique.

Ceci suggère un rapport entre la paralysie de WEDENSKY et le pouvoir anticholinestérasique.

2 - Inhibition de WEDENSKY et cholinestérase. La capacité du muscle strié à soutenir un tétanos est étroitement liée aux variations de la cholinestérase musculaire, c'est ce que prouvent les recherches de nombreux auteurs :

Les essais de BERRY et LOVATT EVANS (1951) [6] ont montré que la rétrocession du phénomène de WEDENSKY est obtenue sans que l'inhibition des cholinestérases soit modifiée de façon mesurable.

BARNES et DUFF (1953) [1] trouvent que le pouvoir de soutenir un tétanos à 50 stimuli/sec. disparaît sous l'effet du paraoxon quand 10/100 environ de la cholinestérase initiale sont encore présente dans le muscle. Le tétanos réapparaît lorsque 5/100 de la pseudocholinestérase et pratiquement pas de vraie cholinestérase ont été libérées de l'inhibiteur. Ces valeurs ont été calculées d'après les temps de disparition et de réapparition des tétanos, grâce aux constantes d'inhibition et de réactivation de la vraie et de la pseudocholinestérase du Rat pour le paraoxon (DAVISON, 1953) [30]

HOLMES et ROBINS (1955) [35] étudient le pouvoir de différentes oximes à régénérer in vitro la cholinestérase inhibée par les organophosphorés. Sur les préparations isolées, ces produits restaurent rapidement les tétanos du diaphragme du Rat préalablement abolis par le Sarin, le T.E.P.P. et le D.F.P. La réversibilité de cette paralysie s'accompagne d'une rétrocession de l'inhibition enzymatique (86 à 70/100)

BARNES (1960) [5] par la mesure manométrique des activités enzymatiques, donne des résultats plus précis. L'inhibition des tétanos est réalisée avec le D.F.P. et la réactivation par le P.A.M. Dans une deuxième série d'expérience, les valeurs de l'activité cholinestérasique sont calculées à partir des constantes de vitesse et des temps de réactivation, en opérant cette fois avec des inhibiteurs organophosphorés réversibles (méthylparaoxon, diméthylfluorophosphate). Les valeurs de l'activité cholinestérasiques mesurées et calculées, concordent approximativement. Elles sont telles que 8/100 de l'activité initiale suffisent pour que les contractions tétaniques soient correctement soutenues pour un tétanos à 30 stimuli/sec. 10 à 15/100 sont nécessaires pour un tétanos à 60 stimuli/sec, et 15 à 20/100 pour un tétanos à 120 stimuli/sec. Cependant, la constante de vitesse de réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase, déterminée dans ces expériences, est insuffisante pour rendre compte de la réversibilité de l'inhibition de WEDENSKY, la butyrylcholinestérase (pseudocholinestérase) joue sans doute un rôle adjuvant

HOLMES et ROBINS (1953) [34] ont montré que la paralysie de WEDENSKY semble être un phénomène jonctionnel puisque les nerfs et les muscles ne semblent pas altérés.

détectées semi-quantitativement avec la méthode histologique de KOELLE. De plus, la dépression réversible des réponses tétaniques correspond toujours à des altérations elles-mêmes réversibles de l'excitabilité et de la conductibilité des fibres nerveuses, altérations d'autant plus importantes et précoces que le nerf est stimulé à fréquence plus élevée.

Enfin HOLMES et ROBINS (1953 [35] n'ont pas réussi, chez le Chat, à mettre nettement en évidence une action antagoniste des oximes vis-à-vis de la paralysie par les organophosphorés.

L'atteinte nerveuse semble donc prédominante dans ces conditions expérimentales.

3 - Effet anticurare des anticholinestérasiques.

L'action anticurare des inhibiteurs organophosphorés est en relation directe avec leur pouvoir d'inactiver la cholinestérase. Cet effet a été décrit par de nombreux auteurs sur un grand nombre de tests, par exemple : CHASE et coll. (1947) [13] montrent que le D.F.P. prolonge le temps de chute de la tête du lapin pour un certaine dose de d-tubocurarine. HUNT (1947) [37] étudie l'effet du D.F.P. sur l a préparation neuromusculaire du Chat, etc...

L'action anticurare de certains dérivés organophosphorés est limitée par leur faible solubilité dans les solutions salines : le tabum, l'un des inactivateurs les plus puissants et des plus difficilement réversibles de la cholinestérase, antagonise la d-tubocurarine, mais toujours sur un mode très graduel.

Au contraire, les alkylphosphates plus solubles dans l'eau ont une activité anticurare beaucoup plus rapide, par exemple : l'hexaéthyltétraphosphate (H.E.T.P. : 9,5 mg/kg) détermine le rétablissement rapide des contractions du gastrocnémien du Chat préalablement bloquées par le curare. BURGEN et coll. (1949) [10] décrivent l'action semblable du T.E.P.P. sur la préparation nerf phrénique - diaphragme isolée du Rat.

Les fortes doses d'anticholinestérasique organophosphoré ne donnent plus le même effet : la paralysie des contractions musculaires, consécutive à

détectées semi-quantitativement avec la méthode histologique de KOELLE. De plus, la dépression réversible des réponses tétaniques correspond toujours à des altérations elles-mêmes réversibles de l'excitabilité et de la conductibilité des fibres nerveuses, altérations d'autant plus importantes et précoces que le nerf est stimulé à fréquence plus élevée.

Enfin HOLMES et ROBINS (1953 [35]) n'ont pas réussi, chez le Chat, à mettre nettement en évidence une action antagoniste des oximes vis-à-vis de la paralysie par les organophosphorés.

L'atteinte nerveuse semble donc prédominante dans ces conditions expérimentales.

3 - Effet anticurare des anticholinestérasiques

L'action anticurare des inhibiteurs organophosphorés est en relation directe avec leur pouvoir d'inactiver la cholinestérase. Cet effet a été décrit par de nombreux auteurs sur un grand nombre de tests, par exemple : CHASE et coll. (1947) [13] montrent que le D.F.P. prolonge le temps de chute de la tête du lapin pour un certaine dose de d-tubocurarine. HUNT (1947) [37] étudie l'effet du D.F.P. sur la préparation neuromusculaire du Chat, etc...

L'action anticurare de certains dérivés organophosphorés est limitée par leur faible solubilité dans les solutions salines : le tabum, l'un des inactivateurs les plus puissants et des plus difficilement réversibles de la cholinestérase, antagonise la d-tubocurarine, mais toujours sur un mode très graduel.

Au contraire, les alkylphosphates plus solubles dans l'eau ont une activité anticurare beaucoup plus rapide, par exemple : l'hexaéthyltétraphosphate (H.E.T.P. : 9,5 mg/kg) détermine le rétablissement rapide des contractions du gastrocnémien du Chat préalablement bloquées par le curare. BURGEN et coll. (1949) [10] décrivent l'action semblable du T.E.P.P. sur la préparation nerf phrénique - diaphragme isolée du Rat.

Les fortes doses d'anticholinestérasique organophosphoré ne donnent plus le même effet : la paralysie des contractions musculaires, consécutive à

l'administration d'une forte dose de D.F.P. (200 à 500 µg/ml) dans le bain d'une préparation nerf phrénique - diaphragme isolée du Rat, est augmentée par la d-tubocurarine, les deux substances agissent alors en synergie (BASTAD 1956 [3.]

C - CONCLUSIONS

Au cours de cette étude, nous avons rencontré une série de phénomènes réversibles, provoqués par des agents anticholinestérasiques déterminant une inhibition prolongée des cholinestérases, cette inhibition n'a pas rétrocédé de façon mesurable lorsque ces phénomènes ont disparu, tels que : sensibilisation à l'acétylcholine et aux sels d'ammonium quaternaire, paralysie des contractions à basse fréquence et dans une certaine mesure à haute fréquence, etc.....

Plusieurs interprétations sont proposées :

1 - La plus classique, basée sur l'insuffisance des moyens mis à notre disposition pour doser les cholinestérases, suppose qu'une activité cholinestérasique très faible et partant non mesurable, suffit à maintenir la fonction.

2 - Une autre interprétation probable pour certains phénomènes (paralysies, sensibilisation à divers effecteurs) consiste à admettre l'intervention d'une sensibilisation ou d'une dépression indépendante d'une action enzymatique et s'exerçant directement sur le neurorécepteur de la plaque motrice.

On sait que parmi les substances ammonium quaternaire, beaucoup sont de puissants agents bloquants neuromusculaires, ce sont, en même temps des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (faibles cependant, comparés à l'action des dérivés organophosphorés) (RIKER et WOESCOE (1953) [48] et COHEN et WARRINGA (1955) [28].

Ces propriétés communes appartenant à une même classe de dérivés conduisent à supposer une parenté de structure entre le neurorécepteur et la surface active de l'enzyme.

C'est pourquoi COHEN et POSTHUMUS (1955) [26], plutôt que d'attribuer l'effet sensibilisateur du neurorécepteur par les anticholinestérasiques

organophosphorés (D.F.P.) à un nouveau mécanisme, proposent une extension de la théorie classique de l'inhibition de la cholinestérase.

Pour ces auteurs, le neuro-récepteur possède au moins trois variétés de modèle moléculaire :

Les groupes A : ou sites "anioniques" spécifiques, qui se combinent avec l'extrémité cationique de l'effecteur (acétylcholine ou autres substances ammonium quaternaire dépolarisantes) et entraînent sa dépolarisation.

Les groupes C : ou sites "anioniques" non spécifiques. Naturellement capables de se combiner aux substances cationiques, mais non d'entrainer la dépolarisation. Cette combinaison peut déterminer le blocage du récepteur si le cation est grand (pachycurares) et recouvre les lieux spécifiques (Groupes A)

Enfin, les groupes B : ou sites "estérasiques" qui se combinant au D.F.P. Ces groupes sont probablement identiques à ceux qui existent dans toutes les estérases, mais ils sont incapables de doter le neurorécepteur d'une activité estérasique. Par contre, ils augmentent la réponse à la combinaison ultérieure des effecteurs avec les groupes A.

L'action du D.F.P. et d'autres anticholinestérasiques sur les muscles de Grenouille et de mammifères s'explique aisément si les cholinestérases (vraie et pseudo) et les récepteurs neuromusculaires ont en commun les groupes B. L'action pharmacologique est alors le fruit d'un double mécanisme :

1 - Le mécanisme classique d'inhibition de la cholinestérase qui correspond à la combinaison de l'anticholinestérasique avec les groupes B de la vraie cholinestérase.

2 - La combinaison avec les groupes B du neurorécepteurs qui détermine une augmentation de sa sensibilité des groupes A à l'acétylcholine et à d'autres effecteurs.

Ces deux mécanismes conduisent au même effet qui estl'augmentation de l'action de l'acétylcholine, soit exogène (additionnée au bain); soit endogène (produite par stimulation).

Mais le second mécanisme rend compte de la sensibilisation par les organophosphorés, de la préparation aux substrats (substances ammonium quaternaire : décaméthonium, édrophonium, succinylcholine, etc....) qui ne sont pas hydrolysés par la cholinestérase et explique la réversibilité partielle ou totale de cette action alors que l'activité cholinestérasique reste nulle.

3) - Une troisième catégorie d'interprétations est importante à considérer : celle du processus d'adaptation du neuro récepteur à l'effecteur :

Les travaux de THESLEFF (1955) [50 51] ont montré que la dépolarisation, consécutive à l'administration d'acétylcholine au muscle sartorius de Grenouille, est généralement brève, alors que le blocage neuromusculaire se maintient malgré la repolarisation complète de la membrane. Ce phénomène persiste même si la concentration d'acétylcholine augmente, et disparaît après l'élimination du produit.

Une expérience de BARSTAD (1956) [3] illustre d'une manière indirecte cette transformation progressive du mécanisme de la paralysie par l'acétylcholine :

Sur la préparation nerf-phrénique - diaphragme isolée du Rat, stimulée à basse fréquence, la dépression causée par l'acétylcholine est antagonisée par la d - tubocurarine à un stade précoce (2 à 4 min.), elle est potentialisée à un stade plus tardif (15 min. et plus).

4) - Enfin, une nouvelle hypothèse développée par KOELLE (1962) [40] admet un mécanisme de "self amplification" de la libération du transmetteur. Cette hypothèse s'insère dans la théorie classique de la transmission neuromusculaire :

L'acétylcholine, libérée à la terminaison nerveuse par l'action dépolarisante du potentiel d'action, agit par retour sur la terminaison elle-même pour maintenir l'état dépolarisé jusqu'à ce qu'une quantité d'acétylcholine suffisante pour produire la dépolarisation des récepteurs post-synaptiques soit libérée. Le jeu de l'acétylcholinestérase présynaptique limitera et arrêtera cette action. Le rôle joué par ce processus serait plus important au niveau des synap-

ses ganglionnaires, car il correspond à une répartition de l'enzyme et à un niveau de fonctionnement physiologique différent de celui que l'on trouve au niveau de la jonction neuromusculaire. C'est une hypothèse de travail qui permet d'introduire la notion de site choline-récepteur des terminaisons nerveuses présynaptiques des fibres cholinergiques et non cholinergiques.

oOo

II - METHODES EXPERIMENTALES

I - MONTAGES NEUROMUSCULAIRES IN SITU (LAPIN ET CHAT)

Les considérations théoriques et les détails techniques sur les préparations neuromusculaires in situ, résumés ici, sont extraits de la thèse de pharmacie de F. BOURILLET [8], où ils sont développés et exposés avec une particulière clarté.

A / CONSIDERATIONS THEORIQUES ET PRATIQUES

1 / Choix de l'animal

Pour ce travail, le Lapin a été notre principal animal d'expérience. Ses réactions sont moins fidèles et moins spécifiques que celles du Chat, mais les difficultés d'approvisionnement pour cet animal sont telles que nous ne nous en sommes servis que pour confirmer les résultats acquis sur le Lapin.

2 / Anesthésie

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé le mélange chloralose-mébubarbital, administré par voie intra veineuse :

a) chez le lapin

Chloralose = 100 mg/kg, solution tiède à 1 % dans la solution chlorurée sodique physiologique.

Mébubarbital = 18 mg/kg (nembutal vétérinaire à 65 mg/kg, ajouté dans la seringue juste avant l'injection.)

b) Chez le chat

Chloralose = 80 mg/kg

Mébubarbital = 18 mg/kg

préparés avec les mêmes précautions.

L'anesthésie est immédiate et de longue durée (6 à 8 heures) mais nécessite la mise en respiration artificielle de l'animal dans les délais les plus courts.

3 / Appareil de contention et myographe

Facilement réalisable dans tous les laboratoires de pharmacodynamie, il permet la fixation de la préparation et l'enregistrement mécanique de l'amplitude des contractions musculaires selon le principe de l'enregistrement isotonique.

Sur une planche épaisse à contention de 85 x 30 cm, est solidement fixée à l'un des angles une tige métallique rigide de 20 cm de hauteur. Celle-ci est destinée à maintenir en place au moyen de noix métalliques une ou deux poulies montées sur tige à double articulation perpendiculaire et un support à tambours manipulateurs reliés à des tambours inscripteurs. Une planchette comportant un bouchon de liège et un bouchon de caoutchouc de moindre épaisseur munie d'un double lien, est adaptée sur une planche à contention du même côté que la tige métallique et à une dizaine de cm de celle-ci ; ce dernier dispositif servira à l'immobilisation absolue de la patte de l'animal.

4 / Choix de l'excitation

a) Le circuit est constitué par les pièces suivantes :

- un stimulateur électronique (1), conçu pour délivrer des impulsions rectangulaires dont les paramètres, durée (largeur), amplitude (tension) et fréquence (nombre d'impulsions/sec.) peuvent varier indépendamment les uns des autres.

- les électrodes, en plexiglass et platine de très petite dimension, avec paroi mobile réalisant un canal dans lequel est emprisonné le nerf.

Pour le Lapin, le canal doit avoir un diamètre de 1,5 mm.

Pour le Chat, le canal doit avoir un diamètre de 2 mm.

(1) Etablissements RACIA - Bordeaux

b) Les paramètres d'excitation :

- La fréquences : la fréquence de 6 stimuli/min. donne des réponses suffisamment distantes les unes des autres et qui restent constantes pendant plusieurs heures (6 à 8 h).

Dans quelques expériences, nous avons utilisé des fréquences tétaniques à 30, 60 et 120 stimuli/sec.

- La durée ou largeur de l'onde et le voltage ou hauteur de l'onde : le jeu combiné de ces deux paramètres permet de fixer l'amplitude de la réponse musculaire de telle manière que les unités motrices du muscle répondent toutes ensemble et qu'elles ne répondent qu'une seule fois pour chaque stimulus.

- La durée ou largeur de l'onde : Pour des durées trop courtes ($\leqslant$ 0, 1 msec), les unités motrices ne sont pas toutes stimulées et les contractions musculaires sont submaximales et d'inégale hauteur.

Pour des durées trop longues (de 1 ou 2 à 5 msec.), certaines unités motrices répondront deux fois : à la fermeture et à l'ouverture du circuit, et la réponse mécanique sera supramaximale.

Au contraire, pour des durées moyennes (de 0, 2 à 1 ou 2 msec), toute les unités motrices répondront et ne répondront qu'une fois ; les réponses sont maximales, formant quelque soit le voltage un plateau stable.

- Chez le Chat, nous utilisons dans la pratique des durées qui s'étagent selon les animaux entre 0, 2 et 1 msec, intervalle valable pour les muscles tibial antérieur et soléaire.

- Chez le Lapin, il existe des variations individuelles importantes qui nécessitent une recherche rapide préalable de la durée la plus favorable, les limites de la contraction maximale et unique étant étroites (de 0, 2 à 0, 5 msec.).

- Le voltage ou hauteur de l'onde : Une fois déterminée, la durée favorable, on détermine le voltage-seuil, puis on double ce voltage pour être sûr de travailler dans une zone de voltage supramaximal.

Chez le Chat, le voltage-seuil est compris entre 1 et 2 volts ; on prendra donc entre 2, 5 et 4 volts.

Chez le Lapin, le voltage-seuil est d'environ 2 volts ; dans la pratique on prendra donc entre 4 et 6 volts.

B / DESCRIPTION DES PREPARATIONS

1 / Chat

a) Anesthésie : animal jeune, d'environ 2,5 kg, auquel on injecte la solution tiède de chloralose-mébubarbital :

- soit par voie intra veineuse dans la veine saphène interne,
- soit par voie intra péritonéale si l'animal est particulièrement agressif.

On établit immédiatement la respiration artificielle.

b) Préparation de la voie d'introduction des produits

- soit par voie intra veineuse : on introduit une canule dans la veine jugulaire externe.
- soit par voie artérielle : on utilise la technique de BULBRING et BURNS[9]qui consiste à introduire un cathéter à contre-courant dans l'artère iliaque externe correspondant au côté opposé de la patte où se trouvera la préparation neuromusculaire. Cette voie d'administration permettra d'obtenir une action plus rapide, plus localisée, et d'utiliser des doses plus faibles. Le volume total d'une injection ne devra pas dépasser 0,5 à 0,7 ml.

c) Préparation du sciatique

On rase la patte choisie. On sectionne la peau du creux poplité jusqu'aux muscles fessiers. On sépare les masses musculaires des muscles biceps fémoral et demi-tendineux, et l'on atteint le nerf sciatique que l'on isole délicatement sur toute la longueur de la cuisse. On place deux ligatures très serrées le plus haut possible sur le nerf et distantes d'environ d'un demi-centimètre l'une de l'autre.

d) Fixation de la patte

La fixation de la patte doit être parfaitement réalisée pour obtenir des tracés réguliers. Elle est assurée au niveau de l'articulation du genou et au niveau du jarret.

On sectionne la peau et le aponévroses sur une longueur de 2 ou 3 centimètres perpendiculairement à la partie antérieure de l'articulation fémoro-tibiale, de manière à mettre à nu la région condylienne du fémur.

On traverse les condyles fémoraux de part en part à l'aide d'une vrille dont la mèche a environ 3, 5 mm de diamètre. La mèche sera fixée à l'appareillage après isolement et séparation des muscles.

e) Préparation du tibial antérieur

" C'est le plus volumineux des muscles de la région antérieure : il est situé au plan superficiel en avant et en dedans de l'extenseur commun des doigts et forme le bord antérieur de la jambe... son tendon arrondi s'engage sous la bride tibiotarsienne du pli du jarret pour gagner le métatarsien du doigt II" (J. BOURDELLE et BRESSOU) [7]

On dégage le tendon sur 2 centimètres après son insertion osseuse métatarsienne et on le sectionne. On coupe la peau et les aponévroses à la face antérieure de la jambe. On libère le tendon en le glissant sous la bride tibiotarsienne. On le lie solidement avec un gros fil de 20 cm de longueur environ. Ensuite, le muscle est libéré sur sa face interne, le plus haut possible en respectant soigneusement le hile principal où s'insère le pédicule vasculo-nerveux. Le muscle est humécté périodiquement de soluté chloruré sodique physiologique pour éviter sa dessication.

f) Préparation du soléaire

"C'est un muscle du mollet, relativement volumineux, situé au côté externe des jumeaux. Le corps charnu aplati s'engage... sur le jumeau externe et se continue par un tendon long arrondi que l'on peut suivre accolé au côté externe du tendon d'Achille jusqu'au niveau du calcanéum où il se termine" (BOURDELLE et BRESSOU) [7]

On sectionne la peau depuis le calcanéum jusqu'au creux poplité. On libère le tendon d'Achille de ses aponévroses et dissèque le fin tendon du soléaire qui se trouve encastré à l'intérieur et du côté externe des autres tendons. On reconnaît le soléaire à sa couleur rose foncée qui contraste avec le rose pâle des autres muscles. On place 3 ligatures :

- une première comprenant tout le tendon d'Achille au ras du calcanéum.
- une deuxième constituée d'un long chef (20 cm) et comprenant tout le tendon d'Achille à 1 cm environ de la précédente.
- une troisième à 1 cm plus loin, comprenant le tendon d'Achille sans celui du soléaire.

Deux sections sont pratiquées entre ces trois ligatures ; il reste un morceau de 1 cm de tendon d'Achille sur lequel est attaché un long fil contenant le tendon du soléaire qui n'a pas été sectionné.

On dissèque alors délicatement le muscle soléaire.

g) Fixation de la patte, des muscles ; mise en place de l'électrode

On place la patte sur les deux bouchons. On enfonce dans l'un la mèche transcondylienne et on serre le lien au niveau du jarret.

Les fils de chaque muscles sont reliés par l'intermédiaire des poulies articulées à chacun des tambours de MAREY, en vérifiant que le muscle travaille dans la direction la plus proche de ses conditions physiologiques.

On fixe l'électrode sur le nerf, le plus près possible du muscle et de telle manière que le pôle négatif soit le plus périphérique.

On branche le neurostimulateur et on attend une demi-heure, pour que la hauteur des contractions se stabilise.

2 / Lapin

On choisit un animal jeune, de 2,5 kg, qui est anesthésié par injection dans la veine marginale de l'oreille, du mélange chloralose-mébubarbital.

L'isolement du sciatique, la préparation du muscle tibial antérieur, la fixation de la préparation s'exécutent avec les mêmes précautions que chez le Chat.

C / AVANTAGES DU MONTAGE NEUROMUSCULAIRE IN SITU

Cette préparation conserve l'innervation et l'irrigation physiologique du nerf et du muscle.

1 / Elle permet une évaluation globale de l'action propre d'une substance sur le complexe "nerf-plaque motrice - muscle", ou sur la plaque motrice seule, si la spécificité d'action de la substance est déjà connue ; c'est le cas anticholinestérasiques employés à dose faible.

Les modifications observées se feront soit dans le sens d'une potentialisation, soit vers une paralysie passagère des contractions. Dans ce dernier cas, la différence de comportement des muscles blancs et des muscles rouges renseignera déjà sur le mécanisme d'action d'une substance curarisante inconnue.

2 / L'influence antogoniste ou potentialisatrice manifestée vis-à-vis des deux grandes classes de paralysants neuromusculaires renseignera sur le mécanisme d'action des substances essayées

Pour notre étude expérimentale, nous avons choisi comme représentant des curarimimétiques : la d - tubocurarine, et, comme représentant des acétylcholinométiques : la succinyldicholine.

L'étude des modifications apportées à la paralysie neuro musculaire peut être réalisée à titre curatif ou à titre préventif. Ce dernier procédé est beaucoup plus délicat et devient particulièrement difficile dans le cas des substances dont l'élimination est lente (organophosphorés). C'est pourquoi nous avons choisi l'étude des actions antagoniste et potentialisatrice à titre curatif, dont nous allons exposer le principe :

a) Etude d'une action antagoniste

On administre le paralysant neuromusculaire de manière à obtenir un arrêt presque total des contractions. Les doses utilisées sont :

d - tubocurarine : 500 à 600 µg/kg en deux injections à 5 min. d'intervalle,

succinyl dicholine : 70 à 80 μg/kg.

Au moment de la reprise des contractions, on injecte le produit supposé antagoniste qui doit entraîner une nette accélération de cette reprise.

b) Etude d'une action potentialisatrice :

On administre le paralysant de manière à obtenir une paralysie d'environ 60/100. Les doses habituelles sont :

d - tubocurarine : 400 à 500 μg/kg en deux injections à 5 min. d'intervalle.

succinyldicholine : 70 à 75 μg/kg.

On attend qu'une reprise des contractions se dessine pour injecter le produit. La potentialisation est caractérisée par une reprise de la paralysie.

Pour qu'une substance soit dite potentialisatrice de la paralysie neuromusculaire, il faut qu'elle ne possède pas, par elle-même, au moins aux doses utilisées, de propriétés paralysantes, sinon on aurait à faire à une synergie ou addition de deux effets du même ordre.

D'une manière générale, on ne doit tenir compte que des actions nettes

D - LIMITES D'EMPLOI DU MONTAGE NEUROMUSCULAIRE IN SITU

Cette préparation est surtout intéressante pour l'évaluation des modifications d'ordre qualitatif.

Dans le domaine quantitatif, les résultats sont d'autant plus précis que l'on injecte les produits plus près du muscle étudié (voie intra-artérielle proche); ils le seront beaucoup moins si l'administration des produits se fait par voie générale ; par contre cette voie d'administration donne une vue plus exacte de l'effet pharmacologique global du produit.

Dans le cas particulier des dérivés organophosphorés, les phénomènes d'accumulation et de sensibilisation compliquent encore l'interprétation quantitative des résultats.

La comparaison avec une substance de référence (le T.E.P.P.) dont l'action est bien connue, et la répétition des expériences, permettront cependant

de se faire une idée grossière de l'intensité d'action de ces produits. C'est pourquoi nous signalons dès maintenant que les coefficients comparatifs que nous établirons par la suite ont seulement une valeur indicative.

II - PRESSION ARTERIELLE

Sur la plupart des préparations neuromusculaires, nous avons jugé nécessaire de prendre le tracé continu de la pression carotidienne de l'animal.

Ceci nous a permis de vérifier si les variations de hauteur des contractions musculaires n'étaient pas influencées par des variations trop importantes de la tension.

La pression artérielle a été enregistrée selon la méthode classique à l'aide d'une canule carotidienne reliée à un manomètre de LUDWIG.

oOo

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE

Nous avons déterminé la dose létale 50 (DL_{50}) sur la Souris blanche de 20 g. en suivant les précautions indiquées dans un récent article de CHEYMOL et collaborateurs (1961) [15]. Comme tous nos produits sont solubles dans l'eau, nous avons utilisé de préférence la voie intraveineuse en injectant la solution dans l'une des veines de la queue de la Souris.

Pour chaque toxicité, nous avons employé unemoyenne de 50 souris, soit un total de 650 animaux pour l'ensemble des 12 dérivés organophosphorés et du T.E.P.P. Les toxicités des 1715 HC, 1717HC et 1718HC ont déjà été publiées par CHEYMOL et coll. [18]

Le T.E.P.P. est pris comme produit de référence.

Les valeurs des toxicités aiguës (DL_{50}) de l'ensemble de ces dérivés organophosphorés et du T.E.P.P. sont rassemblées par le tableau 4, ci-après.(v.p; 43)

Ces résultats amènent quelques remarques :

1 - Le classement des toxicités aiguës (DL_{50}), par ordre de valeur décroissante, en fonction des radicaux aminés, diffèrent d'une série à l'autre

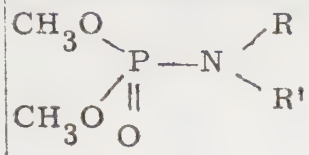
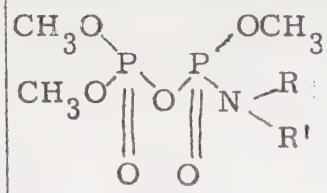
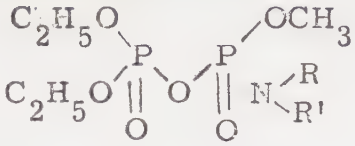
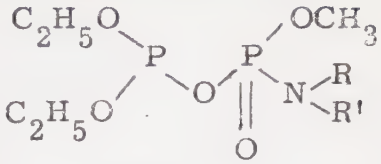
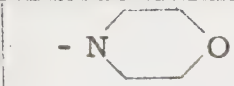
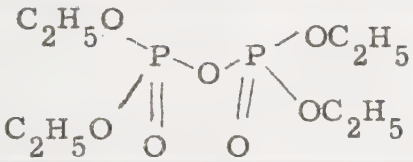
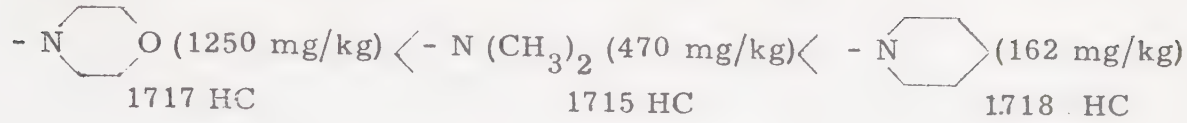
$-N\begin{smallmatrix}R\\R'\end{smallmatrix}$	 (I)		 (II)		 (III)		 (IV)	
	N° conventionnels	Toxicité DL_{50} i/v mg/kg (Souris)	N° conventionnels	Toxicité DL_{50} i/v mg/kg (Souris)	N° conventionnels	Toxicité DL_{50} i/v mg/kg (Souris)	N° conventionnels	Toxicité DL_{50} i/v mg/kg (Souris)
$-N(CH_3)_2$	1715 HC	470	4030 HC	17	4034 HC	0,60	4130 HC	60
$-N(C_2H_5)_2$	-	-	4031 HC	2	4035 HC	0,80	4131 HC	16
	1717 HC	1250	4032 HC	4	4037 HC	1,50	4132 HC	9
	1718 HC	162	4033 HC	25	4036 HC	1	4133 HC	8
T.E.P.P.				0,35				

TABLEAU n° 4

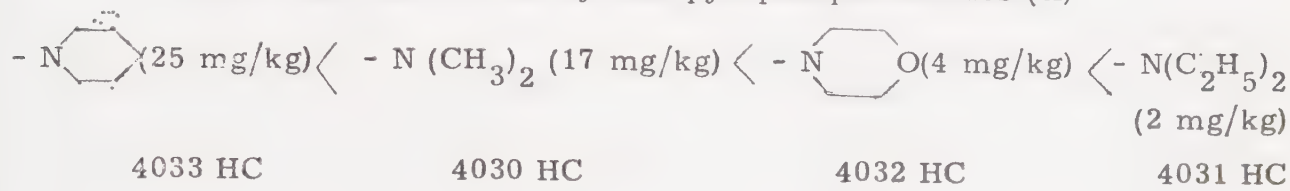
DL_{50} (Souris) des esters diméthyl des phosphoramides (I) des esters triméthyl (II) et monométhyldiéthyl (III,) des pyrophosphoramides, des esters monométhyldiéthyl des hypophosphoramides (IV) et du T.E.P.P.

Les résultats sont calculés selon la méthode BEHRENS et KARBER.

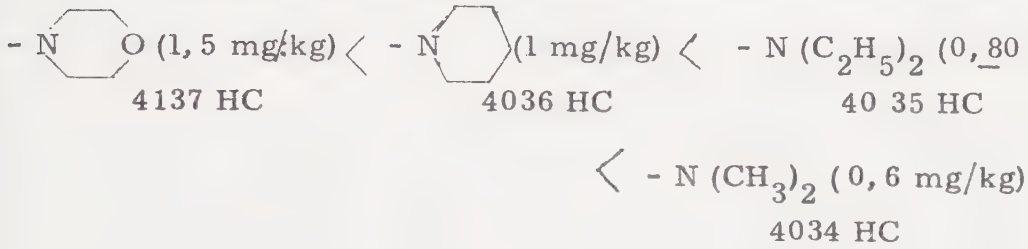
- Série des esters diméthyl des phosphoramides (I)



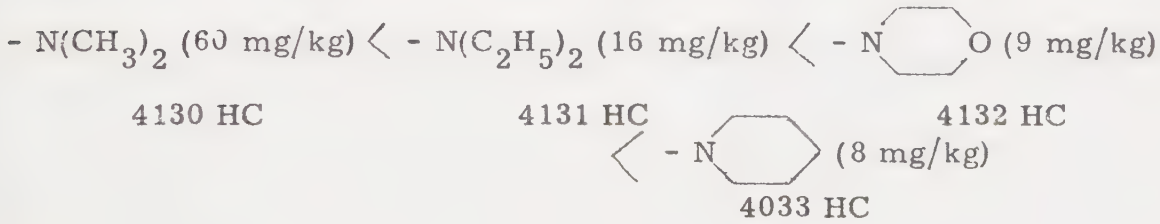
- Série des esters triméthyl des pyrophosphoramides (II)



- Série des esters monométhyldiéthyl des pyrophosphoramides (III)



- Série des esters monométhyldiéthyl des hypophosphoramides (IV)



Le radical aminé ne semble donc pas jouer à lui seul un rôle déterminant pour la toxicité aiguë.

2) - Les toxicités aiguës (DL_{50}) des homologues d'une même série sont relativement voisines les unes des autres :

Les esters des phosphoramides (I) sont de très loin les moins toxiques, puis vient la série des esters monométhyldiéthyl des hypophosphoramides (IV), elle-même très proche de celle des esters triméthyl des pyrophosphoramides (II) Les plus toxiques sont les esters monométhyldiéthyl des pyrophosphoramides (III)

I < IV < II < III

3) Enfin, tous ces dérivés sont en général beaucoup moins toxiques que le T.E.P.P. (tableau 4, voir p.43)

REMARQUE

Il faut noter que certains de ces produits subissent en solution aqueuse une hydrolyse dont les valeurs n'ont pas encore été déterminées, c'est le cas en particulier, des esters des hypophosphoramides (IV). Cette inconnue limite dans une certaine mesure, la confiance que l'on peut avoir pour les toxicités déterminées sur des solutions aqueuses, surtout pour les esters des hypophosphoramides (IV)

II - ACTIVITE NEUROMUSCULAIRE (1)

Cette étude est divisée en deux parties bien distinctes. La première correspond aux esters des phosphoramides (I), la seconde à l'ensemble des esters des pyro(II et III) et des hypophosphoramides (IV)

I - SERIE DES ESTERS DIMETHYL DES PHOSPHORAMIDES (I)

Nous avons observé deux types de réponse bien distincts, caractérisant, d'une part le dérivé 1715 HC et, d'autre part, les dérivés 1717 HC et 1718 HC.

A - ESTER DIMETHYL DU N-DIMETHYL PHOSPHORAMIDE (1715 HC)

1) - Lapin

a) - Action propre

Pour une dose de 200 mg/kg (4/10 de la DL_{50} Souris) on observe d'abord une très courte phase de potentialisation des contractions musculaires (quelques secousses) accompagnées de fasciculations, suivies immédiatement après par une phase de paralysie avec une baisse régulière des contractions qui

---

(1) L'ensemble de notre expérimentation porte sur un total d'environ 70 lapins et 15 chats.

atteignent un minimum, puis les contractions retournent à leur valeur initiale (fig. 4) Cette action biphasique déjà sensible pour une dose de 100 mg/kg (2/10 de la DL_{50} Souris) se poursuit pour les doses supérieures à 200 mg/kg.

L'activité du produit est renouvelable à bref intervalle.

b) - Vis-à-vis de la curarisation par la d-tubocurarine

on observe un antagonisme très net : une dose de 100 mg/kg. (2/10 de la DL_{50} Souris) détermine une reprise instantanée et durable des contractions qui reviennent à la valeur initiale (Figure 6).(v.p. 49)

c) Vis-à-vis de la paralysie par la succinyldicholine

Le 1715 HC détermine une potentialisation très nette de la paralysie par la succinyldicholine : une dose de 100 mg/kg (2/10 de la DL_{50} Souris) provoque une reprise brutale et prolongée de la paralysie (Figure 6).(v.p; 49)

REMARQUE :

La dose de 100 mg/kg (2/10 de la DL_{50} Souris), antagoniste de la d-tubocurarine et potentialisatrice de la succinyldicholine, a très peu d'action paralysante par elle-même sur les contractions musculaires.

2) - Chat

Nous avons retrouvé sur cette préparation le même type d'action que chez le Lapin. L'injection dans l'artère iliaque nous a permis d'utiliser des doses relativement faibles de 1715 HC : une dose de 50 mg/kg (1/10 de la DL_{50} Souris) produit une paralysie du muscle tibial nettement supérieure, dans l'ensemble, à celle du muscle soléaire (Figure 5) :(v. 47)

- sur le tibial, paralysie de 60/100, retour à la normale en vingt min.
- sur le soléaire, paralysie totale mais retour à la normale en 2 min. environ.

[FIGURES 4 et 5]

Notons, chez le chat comme chez le lapin, que le 1715 HC provoque une excitation des récepteurs cholinergiques du système para-sympathique telle que l'augmentation des sécrétions lacrymales et salivaires : effet classique pour un anticholinestérasique.

B - ESTERS DIMETHYL DU N-MORPHOLINO (1717 HC) ET DU N-PIPERIDINO (1718 HC) PHOSPHORAMIDE

L'étude de ces produits a été réalisée sur le Lapin uniquement.

1 - Action propre

Ces dérivés déterminent une potentialisation des contractions : l'augmentation des contractions est immédiate; elle est très durable et facilement renouvelable. On observe une sommation des effets pour chaque nouvelle dose injectée, bien que l'augmentation totale des contractions reste toujours modérée.

L'effet du 1718 HC (figure 4) sur l'amplitude des contractions est plus intense que celui du 1717 HC. Les doses pour lesquelles cette action est déjà sensible sont indiquées sur le (tableau 3 v.p.50)

Nous n'avons jamais observé ni fasciculations musculaires ni manifestations cholinergiques.

2 - Vis-à-vis de la d-tubucurarine

Ces produits potentialisent la curarisation. Cette effet est assez faible pour le dérivé 1717 HC; il commence à se manifester pour une dose de 125 mg/kg (1/10 de la DL_{50} Souris). Il est plus net pour le dérivé 1718 HC avec lequel on l'observe à partir de 20 mg/kg (1/10 de la DL_{50} Souris)(figure 7)(v.p; 49)

Nous avons pu vérifier que la néostigmine gardait ses propriétés antagonistes de la d-tubocurarine aux doses habituelles après l'administration de chacun de ces produits (figure 7)(v.p. 49)

3 - Vis-à-vis de la succinyldicholine

Ces deux dérivés montrent une action potentialisatrice vis-à-vis de la

FIGURES 6 et 7

Figure 6 = Action du 1715 HC antagoniste de la curarisation et potentialisatrice de la paralysie par la succinyldicholine

(Préparation neuromusculaire du Lapin)

Tracé (1) ↑ d-tubucurarine ↓1 1715 HC 100 mg/kg
↓2 1715 HC 100 mg/kg

Tracé (2) ↑ succinyldicholine ↓ 1715 HC 100 mg/kg

(expér. n° 2, et n° 3)

Figure 7 - Action potentialisatrice du 1718 HC sur la curarisation et sur la paralysie par la succinyldicholine.

La néostigmine conserve son action anticurare même après 1718 HC (préparation neuromusculaire du Lapin).

Tracé (1) ↑ d-tubocurarine ↓1 1718 HC 20 mg/kg

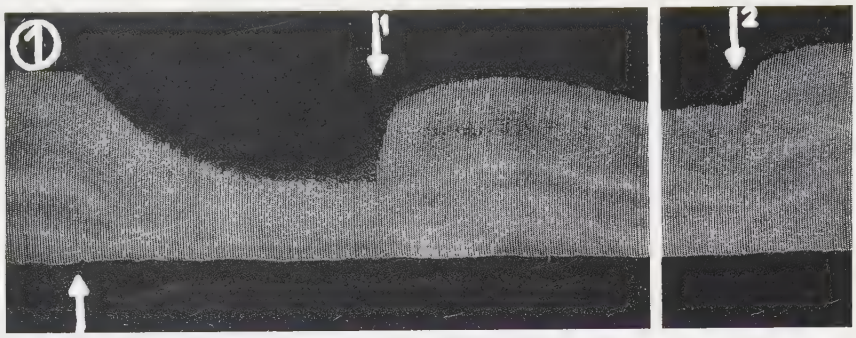
↓2 1718 HC 20 mg/kg ↓3 néostigmine 100 mg/kg

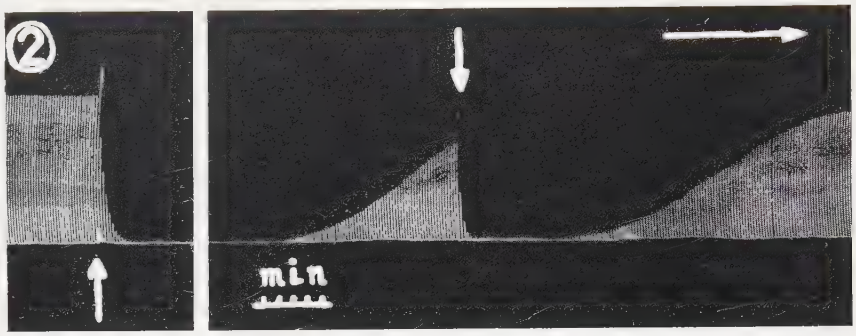
Tracé (2) - ↑ succinyldicholine ↓1 1718 HC 20 mg/kg

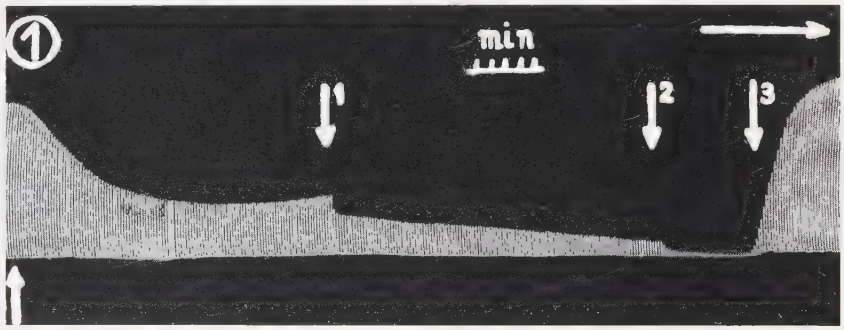
↓2 1718 HC 20 mg/kg ↓3 1718 HC 60 mg/kg

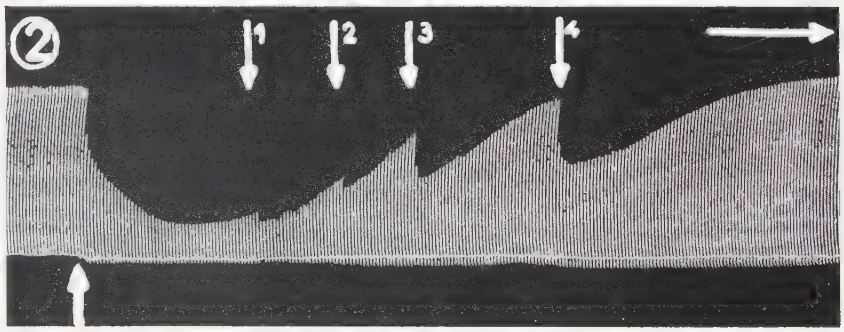
↓4 1718 HC 100 mg/kg

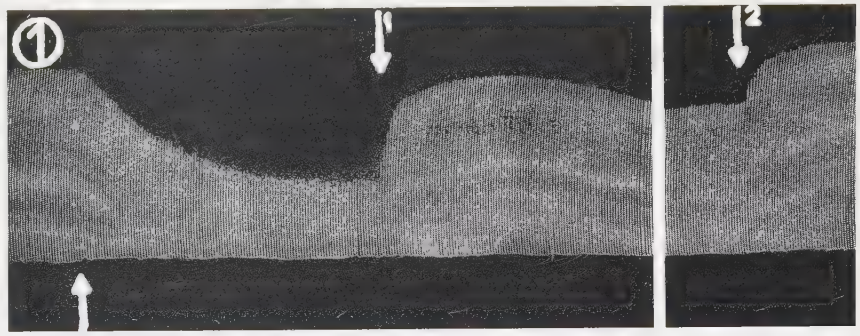
(expér. n° 8 et n° 9)

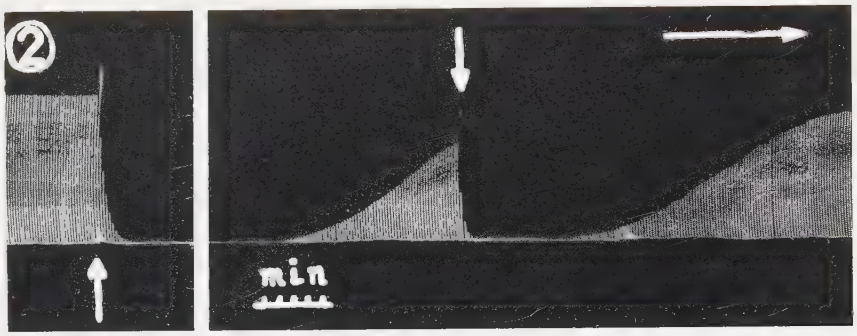

1
1
2

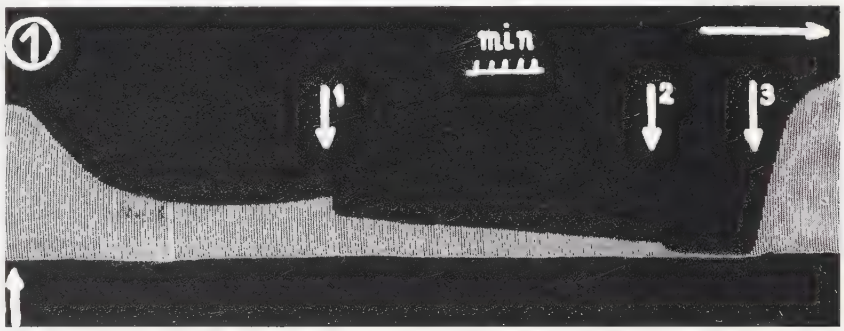

2
min

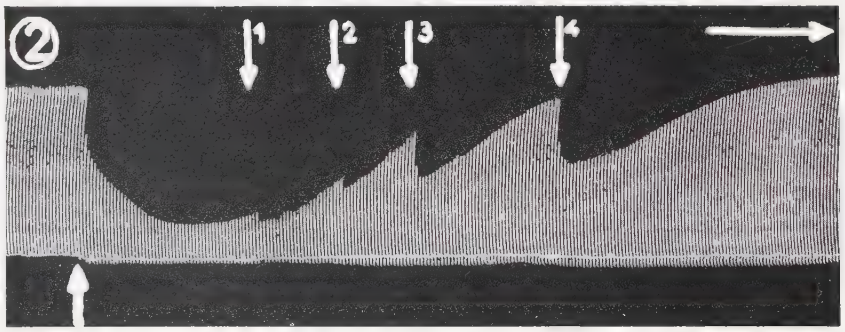

1
min
1
2
3


2
1
2
3
4


1
1
2


2
min


1
min
1
2
3


2
1
2
3
4

Numéros Conventionnel de l'Institut	CH_3O, CH_3O, P, O, N, R, R (I)	ACTION MUSCULAIRE PROPRE			ACTION SUR L'INHIBITION DES CONTRACTIONS PAR LA					
					d-tubocurarine			succinylcholine		
	- N, R, R'	Action	Doses mg/kg	Doses fract. DL_{50} Souris	Action	Doses mg/kg	Doses Fract DL_{50} Souris	Action	Doses mg/kg	Doses Fract DL_{50} Souris
1715 HC	$- N(CH_3)_2$	Très courte + forte	100 à 200	2/10 à 4/10	-	50 à 100	1/10 à 2/10	+	50 à 100	1/10 à 2/10
1717 HC	- N, O	+	625	5/10	+	125	1/10	+	125	1/10
1718 HC	- N	+	32	2/10	+	16	1/10	+	16	1/10

TABLEAU 5

Série des esters diméthyl de phosphoramides (I) - Activité neuromusculaire

+ = potentialisation des contractions musculaires ou synergie,

- = paralysie des contractions musculaires ou antagonisme.

paralysie due à la succinyldicholine. Ici encore, l'activité du 1718 HC (figure 7) (p.49) est supérieure à celle du 1717 HC dont l'action est particulièrement fugace.

Le tableau 5 (v.p.50) résume l'ensemble des activités neuromusculaires de ces dérivés et indique les doses auxquelles elles se manifestent.

II - SERIE DES TRIESTERS DE PYRO et d'HYPOPHOSPHORAMIDES

Les dérivés organophosphorés dont nous abordons maintenant l'étude appartiennent aux trois dernières séries dont nous avons déjà donné une description détaillée dans l'étude chimique (V.p. 3). Ce sont :

- la série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II)
- la série des esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III)
- la série des esters monométhyldiéthyl d'hypophosphoramides (IV)

Chaque série est constituée de quatre produits homologues qui diffèrent par la nature du radical aminé.

L'étude pharmacologique de ces dérivés peut être envisagée dans un même chapitre, car ils possèdent tous des propriétés communes sur les préparations n neuromusculaires du Chat et du Lapin. Leur activité pharmacologique, leur pouvoir anticholinestérasique, leur constitution chimique et même leurs propriétés physiques, les rapprochent du T.E.P.P. Nous choisirons donc le T. E.P.P. comme substance de référence et nous lui comparerons chacun des dérivés organophosphorés à activité égale et en tenant compte de leurs toxicités respectives.

Nous étudierons successivement l'action propre de ces produits sur les contractions musculaires, leurs propriétés modificatrices de l'action curarisante et de la paralysie due à la succynyldicholine.

A - ACTION NEUROMUSCULAIRE PROPRE

1 - Action générale de ces dérivés sur la contraction musculaire

-Sur la préparation neuromusculaire du Lapin, tous ces produits, ad-

ministrés par voie intraveineuse, entraînent une potentialisation des contracmusculaires évoquées par stimulation nerveuse indirecte à fréquence de 6 stimuli/min. et déterminent des fasciculations généralisées. Sur la préparation neuromusculaire du Chat, nous avons retrouvé une action identiques. Le muscle tibial se montre plus sensible que le muscle soléaire.

Dans toutes nos expériences, nous avons pris comme dose initiale le 1/10 DL_{50} Souris/kg. et nous augmentons progressivement les doses par unité de fraction, jusqu'à ce qu'apparaisse l'augmentation des contractions. Nous poussons l'expérience jusqu'à injecter une valeur voisine ou égale à celle de la DL_{50} Souris/kg. et même quelquefois plus. Si la dose initiale est trop forte nous recommençons l'expérience en partant cette fois du 1/100 DL_{50} Souris/kg de manière à déterminer les doses actives avec le plus de précision possible.

a) Proportionnalité, dose activité

Il est difficile de saisir une proportionnalité entre la dose de produit administrée et le pourcentage d'augmentation des contractions. Si on administre à l'animal des doses croissantes séparées par des intervalles de temps suffisamment grands, rien ne se produit d'abord, puis, brutalement, pour une certaine dose, on assiste à une augmentation des contractions qui atteignent d'emblée un maximum, en même temps, apparaissent les fasciculations. Tout se passe comme si nous avions à faire à un phénomène obéissant à la loi du "tout ou rien," ou l'activité se déclenche dès que la quantité de produit dépasse un certain seuil au niveau des récepteurs de la plaque motrice.

Mais il est possible aussi que la proportionnalité dose activité obéisse à une loi exponentielle, telle qu'à de très faibles quantités de produit corresponde une forte augmentation des contractions. Nous avons pu confirmer cette dernière hypothèse grâce à un fractionnement suffisamment grand des doses qui précèdent celle qui détermine d'emblée une augmentation maximum des contractions :

b) - Doses submaximales, maximales et supramaximales

Pour chaque produit, on peut déterminer la dose à laquelle débute l'action potentialisatrice (doses submaximales) la première dose où cette activité est maximale (dose maximale). Enfin, nous avons étudié l'effet des doses supé-

rieures à la dose maximale (doses supramaximales) jusqu'à une valeur égale ou supérieure à celle de la DL_{50} (Souris)

α - Doses submaximales :

Nous avons pu observer qu'il existe un temps de latence entre l'administration du produit et le moment ou débute l'action potentialisatrice. Ce temps de latence est compris entre une dizaine de minutes et zéro. Il diminue rapidement alors que les doses augmentent faiblement.

Le temps de latence, la vitesse à laquelle les contractions atteignent leur maximum, la valeur de ce maximum et la durée totale de l'action jusqu'au retour à la valeur initiale, suivent la même loi de proportionnalité dose-action pour le domaine des doses qui s'étend entre celle où commence l'actionpotentialisatrice et celle où elle est maximum. Les fasciculations, d'abord disséminées, augmentent avec les doses.

β - Les doses maximales :

Aucune proportionnalité ne peut plus être observée ; le temps de latence se réduit au temps circulatoire et devient inappréciable, l'augmentation des contractions est immédiate et atteint son maximum en quelques secousses (+ 100 % à + 200 % de la valeur initiale). La phase de décroissance des contractions se fait généralement en deux temps : d'abord rapide, puis plus lente, les contractions reviennent ensuite à leur valeur initiale.

Cependant, plus la dose de produit injectée a été forte, plus la durée d'action est longue. Les fasciculations secouent durement l'animal pendant toute la durée de l'augmentation des secousses musculaires. Chez l'animal anesthésié (mébubarbital, chloralose), on n'observe jamais de contractures toniques ni de mouvements cloniques, ces derniers apparaissent cependant quelquefois en fin d'expérience, lorsque l'anesthésie s'est dissipée.

γ - Les doses supramaximales :

Pour ces doses, la flèche de potentialisation n'augmente que faiblement oupas du tout. La durée de l'action diminue et la décroissance des contractions se fait de plus en plus rapidement. La hauteur des contractions

passe par une valeur inférieure à la valeur initiale et remonte ultérieurement mais cette remontée est très étalie dans le temps et nous n'avons pas pu la suivre à chaque fois. L'hypotension qui accompagne ces fortes doses ne semble pas expliquer la baisse des contractions, car la pression sanguine est déjà remontée à une valeur moyenne lorsqu'apparaît le minimum des contractions musculaires. Pour des doses égales à plusieurs fois la DL_{50} Souris/kg, on obtient une véritable paralysie des contractions.

2) - Action du T.E.P.P. sur la contraction musculaire

Nous avons déjà remarqué que les propriétés du TEPP désignent tout naturellement cette substance comme produit de référence. Nous avons procédé à toute une série d'expériences sur la préparation neuromusculaire du Lapin, pour nous assurer dans quelle mesure ce choix était justifié.

a) Basse fréquence de stimulation (6 stimuli/min)

α- Doses inférieures à la DL_{50} Souris. De 1/50 (0,007 mg/kg) à 2/10 de la DL_{50} Souris (0,07 mg/kg) aucune action musculaire ne se manifeste. Pour 4/10 de la DL_{50} Souris (0,14 mg/kg) l'action potentialisatrice est d'emblée maximum (+ 100 %) la hauteur des contractions diminue lentement pour revenir à la normale environ une haute après. Les fasciculations sont généralisées.

β- Les doses supérieures à la DL_{50} Souris

Nous avons mis à profit l'action de l'atropine qui diminue considérablement la toxicité générale (cardiovasculaire) des organophosphorés, sans interférer sur leur activité neuromusculaire, comme nous avons pu le constater nous-même (figure 11) (v.p. 61).

Pour les doses supérieures à 1 DL_{50} Souris (0,35 mg/kg) les effets potentialisateurs du T.E.P.P. sur les contractions musculaires changent progressivement d'aspect : aux maxima de plus en plus aigus font suite des décroissances de plus en plus rapides des contractions, jusqu'à des valeurs inférieures à la normale. Les contractions passent par un minimum pour remonter ultérieurement. Pour 4 DL_{50} Souris (1,4 mg/kg) la phase de potentialisation est limitée à quelques secousses, puis unelongue phase de paralysie totale des contractions s'installe. La reprise s'effectue très lentement (45 minutes après). Le

retour à la normale des contractions n'a pas pu être constaté étant donné la durée limitée de l'expérience.

b) - Stimulation à fréquence rapide : 30 ./sec. 60 /sec., 120/sec.

Pour une fréquence de 30/sec. le muscle répond par un tétanos incomplet, pour 60/sec. le tétanos est presque complet, pour 120/sec. le tétanos est parfaitement soutenu. Chaque tétanos est maintenu cinq sec. et un repos de vingt sec. le sépare du suivant. La préparation est stimulée dans l'intervalle de chaque groupe de tétanos et pendant toute la durée de l'expérience à basse fréquence (6/min.). Elle est essayée aux fréquences élevées avant, puis périodiquement après l'injection de T.E.P.P.

Les doses de T.E.P.P. (1/10 de la DL_{50} Souris (0,35 mg/kg) qui ne produisent pas de potentialisation des contractions à basse fréquence, n'apportent aucune modification des tétanos.

Au contraire, aux doses où le T.E.P.P. détermine une augmentation d'amplitude des contractions (4/10 de la DL_{50} Souris) (0,14 mg/kg) apparaît l'inhibition de haute fréquence ou inhibition de WEDENSKY : le muscle devient partiellement ou totalement incapable de soutenir un tétanos. Ainsi, pour cette dose, la potentialisation des contractions à basse fréquence (6 /min) se double d'une inhibition de moitié environ pour le tétanos à 120/sec. (Les tétanos à 30/sec. et 60 /sec. ne sont pas modifiés). Cette inhibition persiste tout le temps que dure l'élévation des contractions, diminue progressivement ensuite, et disparaît en même temps qu'elle.

3 - Propriétés des triesters de pyro (II et III) et d'hypophosphoramides (IV) sur la contraction musculaire, comparées à celles du T.E.P.P.

a) - Mode de comparaison avec le T.E.P.P.

Pour comparer quantitativement l'action des différents produits avec celle du T.E.P.P. nous avons établi un indice d'activité. Pour cela :

- Il faut tenir compte de la toxicité : on exprimera toutes les doses en fraction de la DL_{50} Souris.

- On doit ensuite choisir un test qui permette de comparer les produits à activité égale : on prendra la première dose qui détermine une potentialisation maximale des contractions (dose maximale). Cette dose est en effet beaucoup plus facile à déterminer que celle pour laquelle l'action commence à se manifester (dose submaximale).

L'unité choisie sera la dose de T.E.P.P. qui satisfait ce test. Le coefficient d'activité est donné par le rapport suivant :

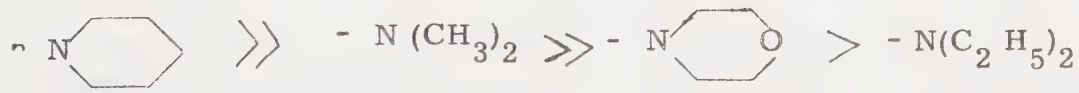
$$\text{Coefficient d'activité} = \frac{\text{dose active T.E.P.P. (en fraction } DL_{50} \text{ Souris)}}{\text{Dose active du produit (en fraction } DL_{50} \text{ Souris)}}$$

Plus cet indice sera élevé, plus l'activité potentialisatrice des produits sera grande. Cet indice n'a aucune valeur absolue, mais exprime simplement un ordre de grandeur, comme nous l'avons déjà signalé (V. page 40).

b) Série des esters triméthyl des pyrophosphoramides (II)

α / Lapin

1. - L'activité potentialisatrice de chacun de ces dérivés sur les contractions musculaires permet de les classer dans l'ordre suivant :



4033 HC 4030 HC 4032 HC 4031 HC

(ne sont représentés ici que les radicaux amines correspondant à chacun de ces dérivés).

Le Tableau 6 (v. p. 57) indique, en mg/kg et en fractions de la DL_{50} Souris/kg, la dose à laquelle débute l'action potentialisatrice et la première dose où cette activité est maximum.

Les dérivés 4033 HC et 4030 HC ont une activité très supérieure aux 4032 HC et 4031 HC. La dose à laquelle commence la potentialisation est de l'ordre de 1/100 de la DL_{50} Souris/kg pour les deux premiers ; elle est de 1/10 de la DL_{50} Souris/kg pour les deux autres. Comparés au T. E. P. P., les dérivés 4033 HC et 4030 HC sont respectivement 25 et 8 fois plus actifs, alors que les dérivés 4032 HC et 4031 HC ont une activité voisine de celle du T. E. P. P.

Numéros conventionnels de l'institut	CH_3O, CH_3O, OCH_3, P, O, P, R, R', N, O, O (II)	ACTION MUSCULAIRE PROPRE (potentialisation des contractions)				Indice d'activité T. E. P. P. = 1
		1ère dose active		dose maximale		
	- N (R, R')	mg/kg	Fraction DL_{50} (Souris	mg/kg	Fract. DL_{50} (Souris)	
4030 HC	$- N (CH_3)_2$	0, 34	1/50	0, 85	1/20	8
4031 HC	$- N (C_2H_5)_2$	0, 60	3/10	1	5/10	1
4032 HC	- N, O	1, 20	3/10	1, 60	4/10	1
4033 HC	- N	0, 20	1/125	0, 40	1/62	25

TABLEAU 6

Série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II)

Activité neuromusculaire.

La Figure 8 montre l'action des 4033 HC et 4030 HC. (v. p. 59)

2. - Expériences à fréquences tétaniques

Doses supérieures à la DL_{50} (Souris)

Pour nous assurer d'une complète identité de mécanisme entre les propriétés des esters triméthyl des pyrophosphoramides et de celles du T. E. P. P., nous avons réalisé pour le 4030 HC des expériences à fréquences élevées de stimulation et étudié l'action des fortes doses sur la préparation atropinisée, selon le modèle des expériences déjà décrites à propos du T. E. P. P.

- Doses supérieures à la DL_{50} Souris

Pour une forte dose de 4030 HC, de 4 DL_{50} Souris (68 mg/kg), nous obtenons une paralysie partielle des contractions à basse fréquence moins intense que celle que nous avons obtenue avec le T. E. P. P. (minimum au 1/3 de la valeur initiale), puis remontée des contractions à la normale en 30 min environ (Tableau 7) (v. p. 60)

- Expériences à fréquences tétaniques

Aux fréquences élevées de stimulation, nous retrouvons, comme pour le T. E. P. P., une inhibition de WEDENSKY.

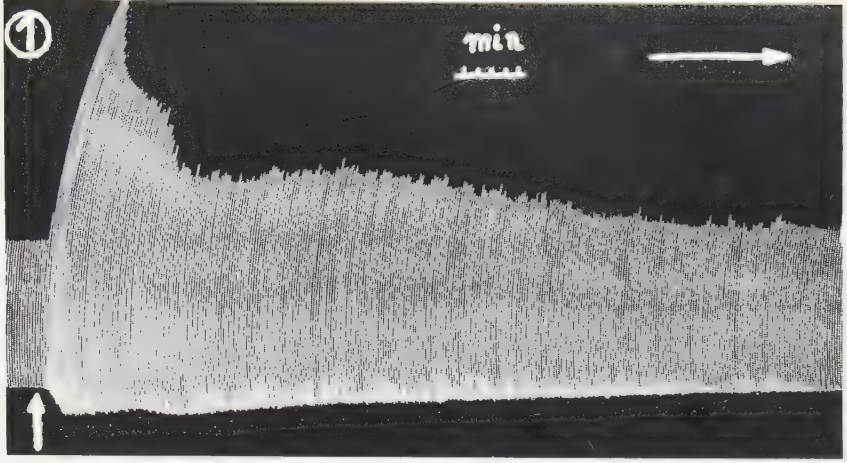
La Figure 10 montre l'effet du 4030 HC. (v. p. 61)

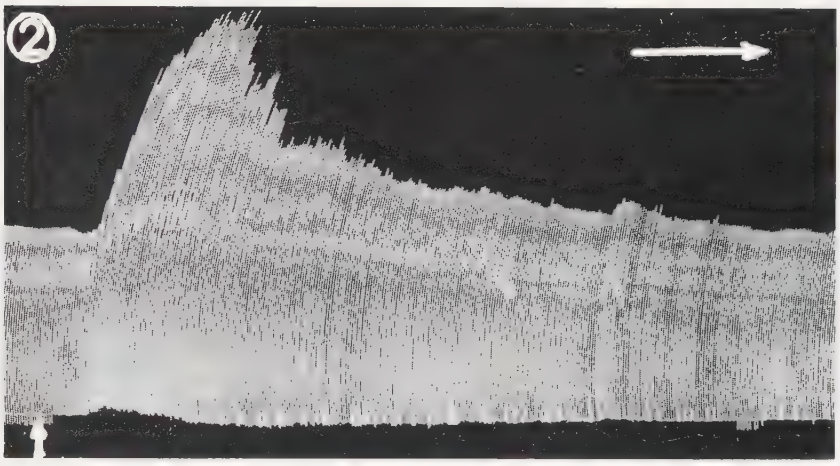
L'inhibition de haute fréquence d'autant plus importante que la dose est plus forte et que la fréquence est plus élevée, comme le montre le Tableau 7 (v. p. 60). On assiste à un retour à la normale des contractions tétaniques parallèlement à la disparition de la potentialisation des contractions à basse fréquence.

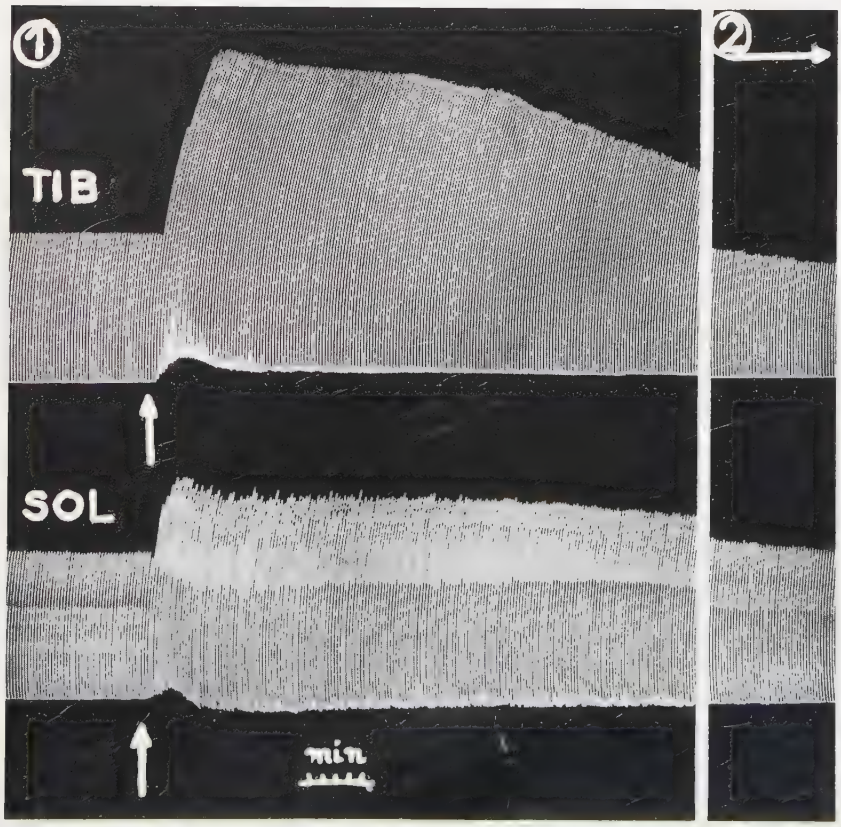
[FIGURES 8 et 9]

Figure 8 : Action musculaire du 4030 HC et du 4033 HC
(Préparation neuromusculaire du Lapin)
Tracé (1) ↑ 4030 HC 1,7 mg/kg
Tracé (2) ↑ 4033 HC 0,4 mg/kg
(Expér. n° 10 et n° 20)

Figure 9 : Action musculaire du 4030 HC
(Préparation nerf sciatique muscles tibial antérieur et scléaire du Chat)
Tracé (1) ↑ 4030 HC 1,7 mg/kg
Tracé (2) 15 min. après
(Exper. n° 25)


1
min


2


1
2
TIB
SOL
min

DOSES		FREQUENCE DE STIMULATION							
Fract. DL_{50} Souris	mg/kg	6 / sec.		30 / sec.		60 / Sec.		120 / sec.	
		Action	Durée min	Action	Durée min.	Action	Durée min.	Action	Durée min.
1/20	0, 85	+100%	35	0		0		-35%	50
1	17	+75%	75	- légère	75	- 40 %	75	- 90%	1 00
4	68	- 30%	60	-30%		- 60%	-60	-100%	1 50

TABLEAU 7

Préparation neuro:musculaire du Lapin.

Produit : 4030 HC - Expérience montrant la variation) en des effets (amplitude et durée totale de l'action) en fonction des doses et de la fréquence de stimulation :

- amplitude en % d'augmentation ou de diminution par rapport à la valeur initiale.

+ = potentialisation des contractions,

- = paralysie des contractions.

- Durée totale de l'action jusqu'au retour à la normale des contractions en minutes.

β - Chat

Nous avons essayé les dérivés les plus actifs, 4033 HC et 4030 HC. Ils ont confirmé les résultats précédents. Les doses actives semblent être un peu supérieures à celles observées chez le Lapin.

La figure 9 montre l'action du 4030 HC (v.p. 59)

c) - Série des esters monométhyldiéthyl des pyrophosphoramides (III)

α) Lapin

Le classement d'après l'activité potentialisatrice s'effectue dans l'ordre suivant :

[FIGURES 10 et 11]

Figure 10 = Action musculaire du 4030 HC, stimulation à basse fréquence (6 min.) et à fréquence tétanique (30, 60 et 120/sec.)(Pression carotidienne et préparation neuromusculaire du Lapin)

Tracé ① Contractions musculaires et tétanos témoin,

Tracé ② ↑ 4030 HC 17 mg/kg potentialisation et inhibition de WEDENSKY

(Exper. n° 11)

Figure 11 Antagonisme 4033 HC - d-tubocurarine

(Préparation neuromusculaire du Lapin)(Voir le texte)

Tracé ① ↑ 4033 HC 1,25 mg/kg ↓[1] Atropine 5 mg/kg

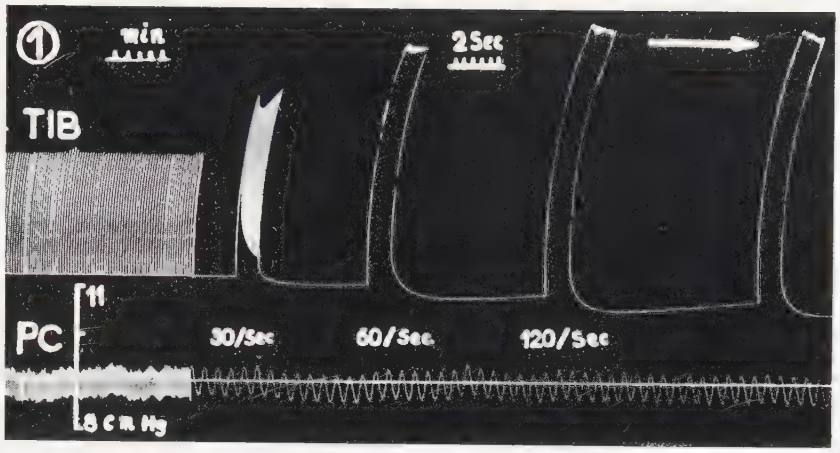
d - tubocurarine 250 µg/kg

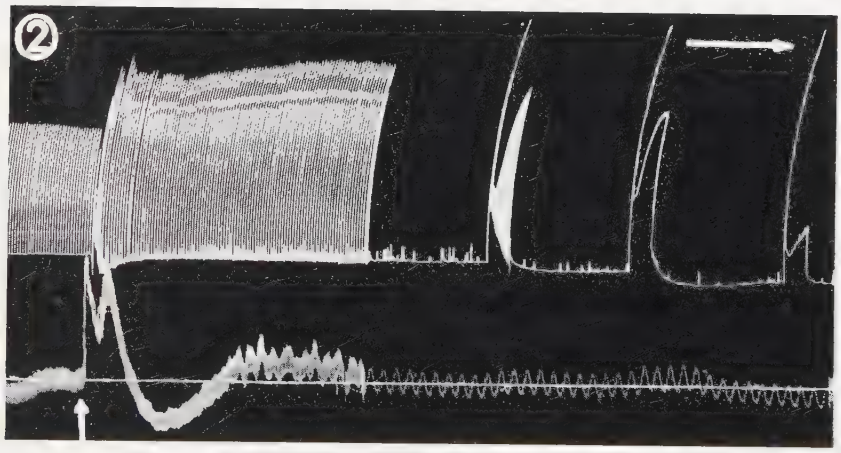
Tracé ② 4033 HC 1,25 mg/kg ↓[1] tubocurarine 250 µg/kg

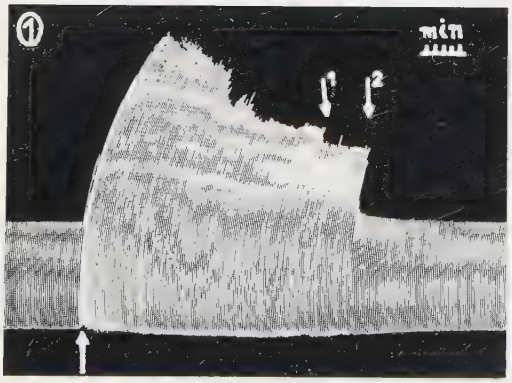
↓[2] d - tubocurarine 500 µg/kg ↓[3] d - tubocurarine 1500 µg/k

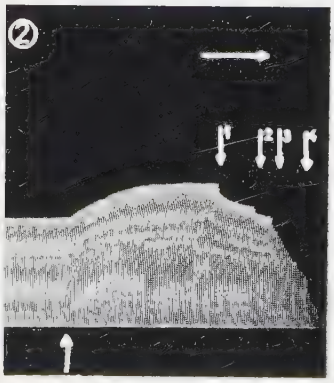
↓[4] d - tubocurarine 1500 µg/kg

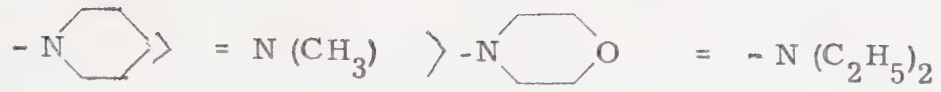
(Exper. n° 22)


1
min
2 Sec
TIB
PC
11
30/Sec
60/Sec
120/Sec
8 cm Hg


2


1
min


2



4036 HC 4034 HC 4037 HC 4035 HC

Les doses potentialisatrices correspondant aux dérivés de cette série sont rassemblées dans le Tableau 8 (v. p. 63).

Les dérivés 4036 HC et 4034 HC ont une activité supérieure aux dérivés 4037 HC et 4035 HC, mais dans des proportions bien inférieures à celles rencontrées pour les esters triméthyl (Voir page57). Les deux premiers ont une action environ deux fois supérieure, les deux autres une activité très voisine de celle du T.E.P.P.

β) - Chat :

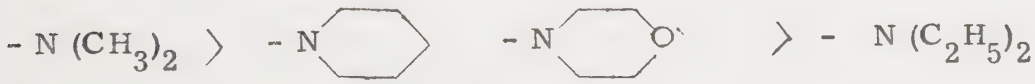
Les dérivés 4036 HC et 4034 HC ont été essayés. On retrouve pour ces produits les activités observées sur la préparation neuromusculaire du Lapin. L'action du 4034 HC semble même un peu plus élevée, le muscle tibial est plus sensible que le soléaire.

d) - Série des esters monométhyldiéthyl d'hypophosphoramides (III)

Tous ces produits ont été essayés sur la préparation neuromusculaire du Lapin uniquement.

Leur hydrolyse en solution aqueuse semble encore plus importante que celle des dérivés précédents, ceci rend leur maniement difficile, d'ou la nécessité de renouveler les solutions avant chaque injection.

Le classement, par ordre d'activité potentialisatrice sur les contractions musculaires, est le suivant :



4130 HC 4133 HC 4132 HC 4131 HC

Numéros Conventionnels de l'Institut	C_2H_5O, C_2H_5O, P, O, P, OCH_3, O, O, N, R, R' (III) / $-N(R)(R')$	ANIMAL	ACTION MUSCULAIRE PROPRE -(Potentialisation des contractions) 1è dose act. mg/kg	1è dose act. Fract. DL_{50} Souris	Dose maximale mg/kg	Dose maximale Fract. DL_{50} Souris	Indice d'activité TEEP = 1
4034 HC	$-N(CH_3)_2$	L	0,24	4/10	0,60	1	⩾ 0,5
		C	-	-	0,12	2/10	2
4035 HC	$-N(C_2H_5)_2$	L	0,20	2,5/10	0,40	5/10	⩾ 1
4037 HC		L	0,30	2/10	0,60	4/10	1
4036 HC		L	0,10	1/10	0,25	2,5/10	⩾ 2
		C	0,10	1/10	0,20	2/10	⩾ 2

TABLEAU 8

Série des esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III)
Activité neuromusculaire :

L = Lapin C = Chat

Numéros conventionnels de l'Institut	C_2H_5O, C_2H_5O, P, O, P, CCH_3, O, N, R, R' (IV) / $-N(R)(R')$	ACTION MUSCULAIRE PROPRE (potentialisation des contractions) 1è dose mg/kg	1è dose Frac. DL_{50} Souris	Dose maxim. mg/kg	Dose maxim. Frac. DL_{50} Souris	indice d'avtivité TEPP = 1
4130 HC	$-N(CH_3)_2$	3	1/20	6	1/10	4
4131 HC	$-N(C_2H_5)_2$	-	-	-	-	-
4132 HC		3,6	4/10	5,4	6/10	0,6
4133 HC		0,8	1/10	1,6	2/10	2

TABLEAU 9

Série des esters monométhyldiétyl d'hypophosphoramides (IV)

Sur le tableau 9 sont indiquées les doses correspondantes (v. p. 63)

Les dérivés 4130 HC et 4133 HC sont les plus actifs : ils sont respectivement quatre fois pour le premier et deux fois pour le second plus puissants que le T. E. P. P.

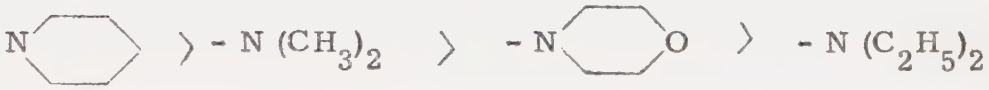
Le dérivé 4132 HC a une activité légèrement inférieure à celle du TEPP. Pour le 4131 HC, nous n'avons pas observé d'action potentialisatrice de plus sa toxicité cardiovasculaire est très forte chez le Lapin.

4 - Conclusion

L'étude de l'activité potentialisatrice sur les contractions musculaires de ces trois séries de dérivés permet de faire les rapprochements suivants :

- La comparaison entre homologues d'une même série fait ressortir l'influence du radical aminé :

Dans chacune des trois séries, nous retrouvons un classement identique :



(sauf dans la série des dérivés de l'acide hypophosphorique ou les dérivés

)

- La comparaison entre les séries met en évidence le rôle des acides et de leurs fonctions esters :

- Les dérivés esters monométhyldiéthyl des pyro (III) et des hypophosphoramides (IV) ont des activités voisines les unes des autres et qui diffèrent peu de celles du T. E. P. P.

- Les esters triméthyl des pyrophosphoramides (II) sont de loin les plus puissants, à condition qu'ils soient conjugués avec les radicaux - N (4033 HC) et - N $(CH_3)_2$ (4030 HC); ils ont alors une action 25 et 8 fois plus forte que celle du T. E. P. P. Au contraire, combiné avec les radicaux - N O (4032 HC) et N $(C_2H_5)_2$ (4031 HC) l'activité s'abaisse et devient égale à celle du T. E. P. P.

B - ACTION DE CES DERIVES SUR LA CURARISATION PAR LA D-TUBOCURARINE

Tous ces dérivés se montrent antagonistes de la curarisation par la d-tubocurarine, mais l'importance de cette action varie beaucoup d'un produit à l'autre.

Pour l'étude de ces propriétés antagonistes, nous avons choisi la méthode "à titre curatif" pour les raisons et selon les modalités qui ont été évoquées dans l'exposé des méthodes expérimentales (v. p. 39)

Nous avons toujours recherché la plus petite dose d'organophosphoré qui produit un retour rapide des contractions à leur valeur initiale, en prenant comme référence la dose qui détermine une potentialisation maximale des contractions. Nous nous sommes assuré enfin que l'action antagoniste persistait pour des doses supérieures.

Les fasciculations n'apparaissent pas après administration de d-tubocurarine, quelle que soit la dose d'organophosphoré injectée.

Dans quelques expériences, nous avons inversé l'ordre d'administration des produits (organophosphorés, puis d - tubocurarine) et nous avons remarqué que :

1 - La d - tubocurarine antagonise la potentialisation des contractions par les organophosphorés pour des doses inférieures aux doses curarisantes :

L'expérience suivante, effectuée avec l'un des produits les plus actifs (4033 HC) met parfaitement ce fait en évidence.

Une dose de 4033 HC (1/20 de la DL_{50} Souris) détermine une potentialisation considérable des contractions. l'Atropine, administrée à une dose de 5 mg/kg, ne produit qu'un minime abaissement. Au contraire, une dose de d - tubocurarine inférieure à celle qui est normalement nécessaire pour produire une curarisation ramène instantanément les contractions à leur valeur initiale et fait cesser immédiatement les fasciculations (figure 11, tracé 1)(v.p. 61)

Une deuxième dose de 4033 HC identique à la première, détermine ensuite une potentialisation considérablement plus faible des contractions, sans

apparition des fasciculations(figure 11, tracé 2).(v.p.61)

2 - Après l'administration d'une dose potentialisatrice d'un de ces produits organophosphorés, la sensibilité de la jonction neuromusculaire à l'effet de la d - tubocurarine est diminuée (figure 11, tracé 2) (v.p. 61)

REMARQUE

Nous avons essayé les injections intra-artérielles (artère iliaque) de manière à obtenir un antagonisme pour des doses plus faibles de produit. Notre attente a été déçue, car jamais nous n'avons pu, par ce moyen, obtenir d'antagonisme net (expérience sur le Chat, 4030 HC et 4033 HC). Il faut un certain temps et une concentration constante dans le sang pour que l'action compétitive puisse se manifester; or, le passage du produit au niveau de la jonction neuromusculaire est sans doute trop rapide pour que l'antagonisme puisse se manifester.

1 - T.E.P.P. et curarisation par la d - tubocurarine

Un antagonisme net se manifeste pour une dose de T.E.P.P. de 0,14 mg/kg (4/10 de la DL_{50} Souris). Cet effet se poursuit pour les doses supérieures, jusqu'à des doses très fortes telles que 3 DL_{50} (animal atropinisé). Même pour cette dernière dose, les fasciculations n'apparaissent pas.

Comme pour l'activité potentialisatrice (V. p. 56) nous avons, pour l'action antagoniste, établi un coefficient d'activité anticurare :

$$\text{Coefficient d'activité anticurare} = \frac{\text{1ère dose anticurare du T.E.P.P. (fraction } DL_{50} \text{ Souris)}}{\text{1ère dose anticurare du produit (fraction de la } DL_{50} \text{ Souris)}}$$

2 - Série des esters triméthyl des pyrophosphoramides (II)

a) - Lapin

L'antagonisme est très net pour chacun de ces produits, contrac-

tions musculaires reprennent immédiatement et retournent dans un délai plus ou moins bref à leur valeur initiale.

La figure 12 montre l'action anticurare de chacun de ces quatre-dérivés. (v. p. 71)

Le classement par ordre d'activité antagoniste est le suivant :

4033 HC 4030 HC 4032 HC 4031 HC

Le tableau 10 donne les doses actives correspondantes :

Numéros Conventionnels de l'institut	CH_3O, OCH_3, CH_3O, P, O, P, O, O, N, R, R' (II) — $-N\begin{smallmatrix}R\\R'\end{smallmatrix}$	ANIMAL	ACTIVITE ANTICURARE — Intensité de l'action	Doses mg/kg	Doses Fract. DL_{50} Souris	Indice d'activité
4030 HC	$-N(CH_3)_2$	L	---	0,42	1/40	16
		C	---	0,85	1/20	
4031 HC	$-N(C_2H_5)_2$	L	--	1,60	8/10	0,5
4032 HC	- N O	L	--	0,80	2/10	2
4033 HC	- N	L	--	0,25	1/100	40
		C	---	1,25	1/20	

TABLEAU 10

Série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II).

Activité anticurare :

--- : forte -- : moyenne - : faible

o : nulle

L = Lapin C = Chat

L'antagonisme est déjà manifeste pour les doses auxquelles l'action propre (potentialisatrice) du produit sur les contractions musculaires est juste perceptible (doses submaximales) (v. - p.53).

L'antagonisme est très net pour les doses auxquelles l'action propre du produit est maximale (doses maximales (v. p. 53)

Enfin, l'effet s'observe même pour les doses élevées; dans ce cas, les contractions atteignent très vite une valeur supérieure à la normale.

- La comparaison avec l'action antagoniste du T.E.P.P. montre encore ici la supériorité des dérivés 4033 HC et 4030 HC qui sont respectivement 40 et 16 fois plus actifs. Le 4032 HC a une action du même ordre que celle du T.E.P.P. Le dérivé 4031 HC est de loin le moins actif.

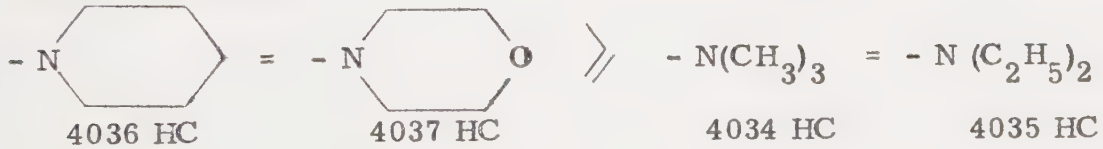
b) - Chat =

L'étude des dérivés 4033 HC et 4030 HC a confirmé cet antagonisme qui est aussi net pour le muscle soléaire que pour le muscle tibial (les doses actives sont cependant plus élevées que chez le lapin.

3 - Série des esters monométhyldiéthyl des pyrophosphoramides (III)

a) - Lapin

Le classement par ordre d'activité apporte une petite variation au schéma habituel.



Le tableau 11 donne les doses anticurares correspondantes(v.p.69)

L'antagonisme vis-à-vis de la d - tubocurarine est total et très net pour les trois premiers dérivés, aux doses pour lesquelles l'activité potentialisatrice propre du produit sur les contractions musculaires commence à se manifester (doses submaximales) et se poursuit quelles que soient les doses utilisées, sauf cependant pour le 4035 HC dont l'activité est difficile à mettre

Numéros conventionnels de l'Institut	C_2H_5O, OCH_3, P, O, P, R, N, R', C_2H_5O, O, O (III) / $-N\begin{matrix}R\\R'\end{matrix}$	ANIMAL	ACTIVITE ANTICURARE			Indice d'activité. TEPP=1
			Intensité de l'action	DOSES		
				mg/kg	Fract. DL_{50} Souris	
4034 HC	$-N(CH_3)_2$	L	---	0,30	5/10	1
		C	---	0,06	1/10	4
4035 HC	$-N(C_2H_5)_2$	L	-	0,40	5/10	1
4037 HC	- N O	L	---	0,15	1/10	4
4036 HC	- N	L	---	0,10	1/10	4
		C	---	0,10	1/10	4

TABLEAU 11

Série des esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III)

Activité anticurare :

--- : forte -- : moyenne - : faible

o : nulle

L = lapin C = Chat

en évidence. L'action antagoniste de ces produits est environ 4 fois supérieure à celle du T.E.P.P. Pour le 4035 HC, l'activité est proche de celle du T.E.P.P.

c) - Chat

Les dérivés 4034 HC et 4036 HC ont été essayés et montrent un antagonisme identique. Le 4034 HC est actif à des doses plus faibles que chez le Lapin

et voisines de celles du 4036 HC (tableau 11). Ceci permet d'intervertir le 4034 HC et le 4037 HC dans le classement précédemment indiqué. La figure 13 montre l'action de ces produits. (v. p. 71)

4) - Série des esters monométhyldiéthyl des hypophosphoramides (IV)

L'antagonisme est ici très faible et difficile à mettre en évidence pour les trois premiers produits. Nous n'avons pas pu observer d'action antagoniste pour le 4131 HC, quelles que soient les doses (tableau 12 (v. p.70). Le schéma classique et la comparaison avec le T.E.P.P. ont peu de signification ici, car l'antagonisme est difficile à mettre en évidence, il se devine plutôt qu'il n'est réel et la différence d'action des produits entre eux est bien faible.

4133 HC 4132 HC 4130 HC 4131 HC

Numéros conventionnels de l'Institut	C_2H_5O, C_2H_5O, P, O, P, O, N, OCH_3, R, R' (IV) — $-N\begin{smallmatrix}R\\R'\end{smallmatrix}$	ACTIVITE ANTICURARE		
		Intensité de l'action	DOSES	
			mg/kg	Fraction DL_{50} souris
4130 HC	$-N(CH_3)_2$	-	6	1/10
4131 HC	$-N(C_2H_5)_2$	O		
4132 HC	- N O	-	1,80	2/10
4133 HC	- N	-	16	2/10

TABLEAU 12

Série des esters monométhyldiéthyl d'hypophosphoramides (IV)

Activité anticurare.

--- : forte -- : moyenne - : faible

O : nulle

[FIGURES 12 et 13]

Figure 12 : Antagonisme de la curarisation par les 4030 HC, 4031 HC 4032 HC, et 4033 HC

(Préparation neuromusculaire du Lapin)

Tracé① ↑ d - tubocurarine ↓4030 HC 0;42 mg/kg
Tracé② ↑ d - tubocurarine ↓4031 HC 1,60 mg/kg
Tracé③ ↑ d - tuborucarine ↓4032 HC 0,80 mg/kg
Tracé④ ↑ d - tubocurarine ↓4033 HC 1,25 mg/kg

(expér. n° 12, n° 15, n° 18, n° 21)

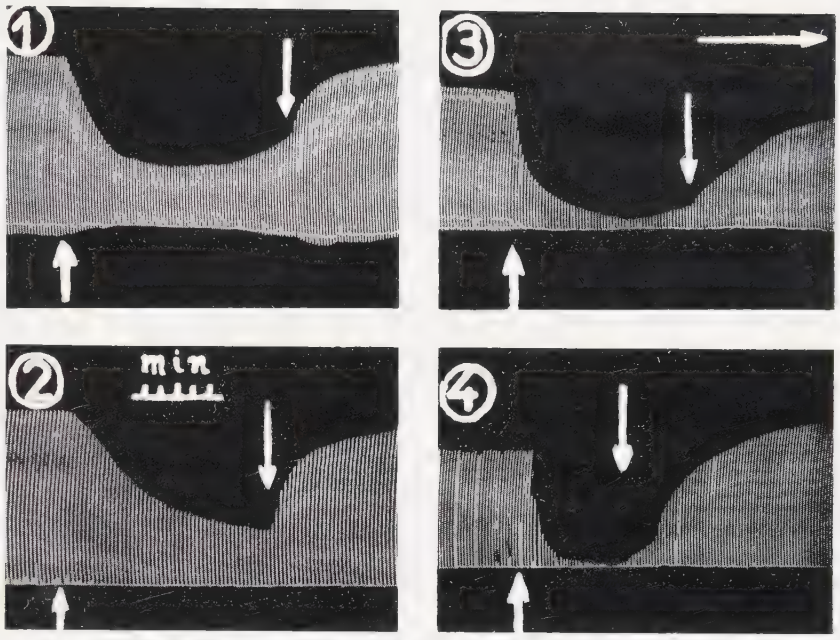
Figure 13 : Antagonisme de la curarisation par le 4036 HC et 4034 HC

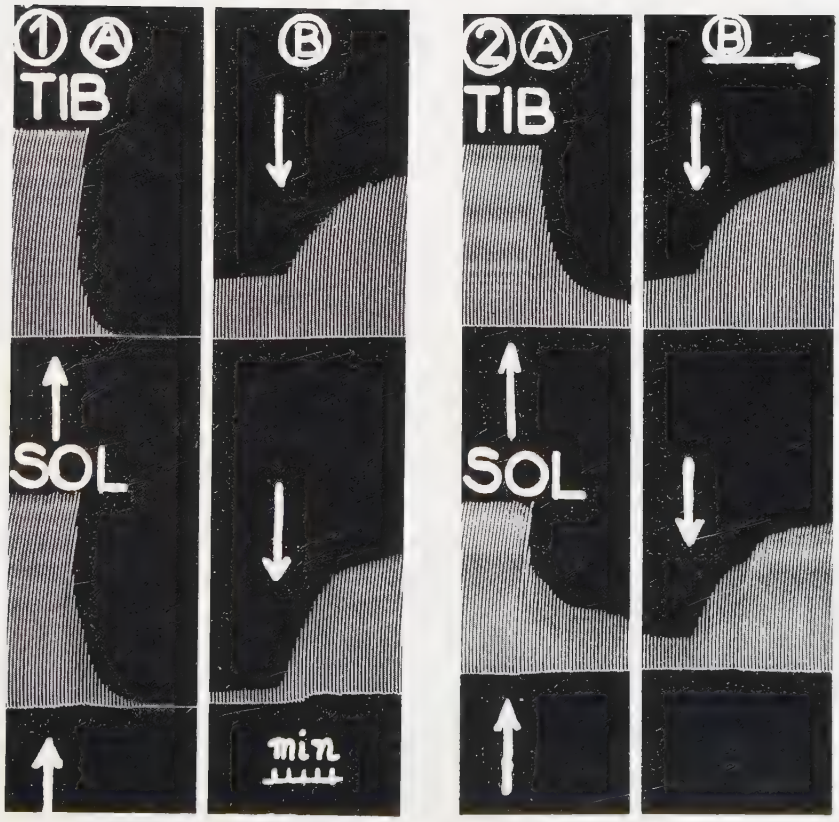
Préparation nerf sciatique, muscles tibial antérieur et soléaire du Chat.

Tracé① Ⓐ ↑ d - tubocurarine Ⓑ ↓4036 HC 0,5 mg/kg

Tracé② Ⓐ ↑ d - tubocurarine Ⓑ ↓4034 HC 0,60 mg/kg

(Exper. n° 50 et n° 58)


1
3
2
min
4


1 A
B
TIB
SOL
min
2 A
B
TIB
SOL

5) - Conclusions

a) - Si dans chacune de ces trois séries, on classe les produits par ordre d'activité antagoniste vis-à-vis de la curarisation par la d - tubocurarine, en fonction du radical aminé, on retrouve partour la même périodicité,

Une exception cependant pour les séries des esters monoéthyldiéthyl de pyro (III) et d'hypophosphoramides (IV) où la place des dérivés portant les radicaux - N $(CH_3)_2$ et - N O est inversée. Mais, dans ces deux séries, les activités sont voisines les unes des autres et une classification stricte est un peu arbitraire. De plus, pour la série des esters monoéthyldiéthyl de pyrophosphoramides (III), l'ordre normal indiqué ci-dessus est rétabli par les expériences faites sur le Chat, comme nous l'avons déjà signalé plus haut (v. p. 69)

b) - Si maintenant nous comparons les trois séries entre elles, nous observons pour chacune des particularités bien évidents =

- la série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II) renferme des produits qui présentent entre eux de grandes différences mais qui montrent tous une activité antagoniste très nette.

La présence des radicaux - N et - N $(CH_3)_2$ confère aux molécules correspondantes (4033 HC et 4030 HC) une activité très puissance : le 4033 HC est 40 fois et le 4030 HC 16 fois plus actif que le T.E.P.P. Au contraire, les radicaux - N O (4032 HC) et le - N $(C_2H_5)_2$ (4031 HC) ont l'un et l'autre une activité très voisine de celle du T.E.P.P.

- La série des esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III) est plus homogène et contient des produits 4 fois plus antagonistes que le T.E.P.P. sauf pour le dérivé contenant le radical - N $(C_2H_5)_2$ (4035 HC)

- Enfin dans la série des esters monométhyldiéthyl d'hypophosphoramides (IV), l'activité antagoniste est difficile à mettre en évidence. Elle est nulle pour le radical - N $(C_2H_5)_2$ (4131 HC). Une comparaison avec le R.E.P.P. présente ici peu d'intérêt.

C - ACTION DE CES DERIVES SUR LA PARALYSIE DES CONTRACTIONS PAR LA SUCCINYLDICHOLINE

Tous ces produits ont été essayés sur la préparation neuromusculaire du Lapin, quatre d'entre eux sur la préparation neuromusculaire du Chat (4030 HC 4033 HC, 4034 HC, 4036 HC).

Nous avons utilisé la méthode "à titre curatif" selon le protocole déjà décrit dans l'exposé des techniques expérimentales (v. p. 39)

Aucune action nette n'a été observée dans la majorité des cas, sauf pour le 4034 HC. On peut cependant mettre en évidence deux actions de type opposé selon les doses :

1 - Pour les faibles doses

On obtient une potentialisation de la paralysie par la succinyldicholine. Mais cette potentialisation est difficile à mettre en évidence et, le plus souvent bien faible; elle se traduit sur le tracé par une légère cassure dans la courbe de remontée des contractions musculaires. La figure 14 met en évidence cette action pour le 4033 HC. (v.p. 75)

Une exception cependant pour le 4034 HC, la reprise de la paralysie est alors immédiate et très nette, comme le montre la figure 15 (v.p. 75)

Dans quelques expériences, nous avons procédé à des injections intra-artérielles dans l'espoir d'obtenir des effets plus caractéristiques. Mais toutes ces expériences se sont soldées par des échecs.

Nous n'avons jamais observé de fasciculations musculaires.

2) - Pour les fortes doses

Au contraire, les fortes doses de produit sont antagonistes de la succinyldicholine. Cet antagonisme est, en général,net. La reprise des contractions est rapide et le niveau final atteint une hauteur égale ou supérieure à la valeur initiale selon l'importance de la dose d'organophosphoré injectée. Les fascicu-

lations accompagnent généralement la manifestation de cet antagonisme. La figure 15 montre le développement de cette action pour le 4034 HC.(v. p. 75)

Il est intéressant pour un même produit de rapprocher le domaine des doses auxquelles on observe une potentialisation de la paralysie par la succinyldicholine, de celui où l'action propre (potentialisatrice) du produit sur les contractions musculaires est juste perceptible (doses submaximales)(v. p.53) On s'aperçoit alors qu'ils coïncident à peu près exactement.

De même, l'intervalle des doses où se manifeste un antagonisme vis-à-vis de la succinyldicholine correspond aux domaines des doses où l'action propre du produit est maximale ou supra-maximale (v. p. 53)

Cette comparaison est objectivée sur le tableau 13 (v. p.76) On voit que les doses qui correspondent aux deux actions opposées, l'action potentialisatrice de la paralysie par la succinyldicholine et l'action antagoniste, se répartissent assez exactement : les premières dans la colonne de gauche, les secondes dans celle de droite.

Les quelques expériences effectuées avec le T.E.P.P. ne nous ont donné aucun résultat valable.

REMARQUE

Tous ces produits ainsi que le T.E.P.P. sans exception sensibilisent les préparations neuromusculaires à la succinyldicholine. A chaque dose nouvelle d'organophosphorés, la succinyldicholine détermine des paralysies de plus en plus longues et prolongées. Cette sensibilisation est particulièrement nette dans les expériences faites chez le Chat et affecte plus nettement le muscle tibial que le muscle soléaire. La figure 14 (v. p. 75) met en évidence cette action sensibilisante pour le 4033 HC.

Une comparaison entre l'activité des différentes séries a peu d'intérêt. Le seul produit particulièrement intéressant est le 4034 HC (ester monométhyldiéthyl du N - diméthylpyrophosphoramide) avec lequel potentialisation et antagonisme de la paralysie par le succinyldicholine se succèdent avec une particulière netteté selon les doses.

[FIGURES 14 et 15]

Figure 14 : Potentialisation par le 4033 HC de la paralysie par la succinyldicholine et inversement.

(Préparation nerf sciatique muscles tibial antérieur et soléaire du Chat).

Tracé① $\uparrow_1$ Succinyldicholine 75 µg/kg $\downarrow^1$ 4033 HC 0,62 mg/kg

Tracé② 40 min. après $\uparrow_2$ succinyldicholine 60 µg/kg $\downarrow^2$ 4033 HC 1,25 mg/kg

Tracé③ 15 min. après

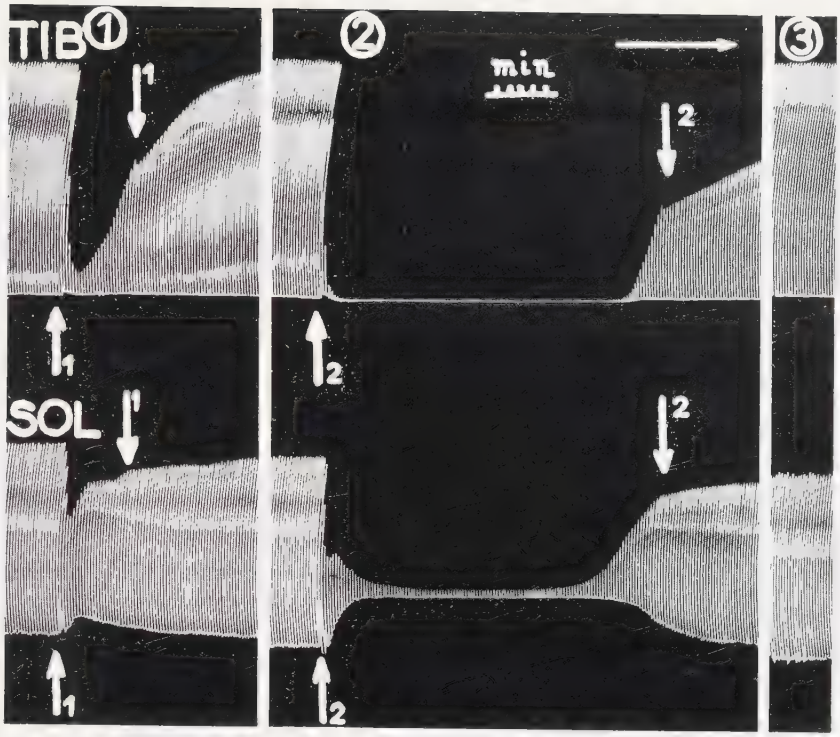
(exper. n 24)

Figure 15 Action potentialisatrice à faible dose et antagoniste à forte dose de 4034 HC sur la paralysie par la succinyldicholine (préparation neuromusculaire du Lapin).

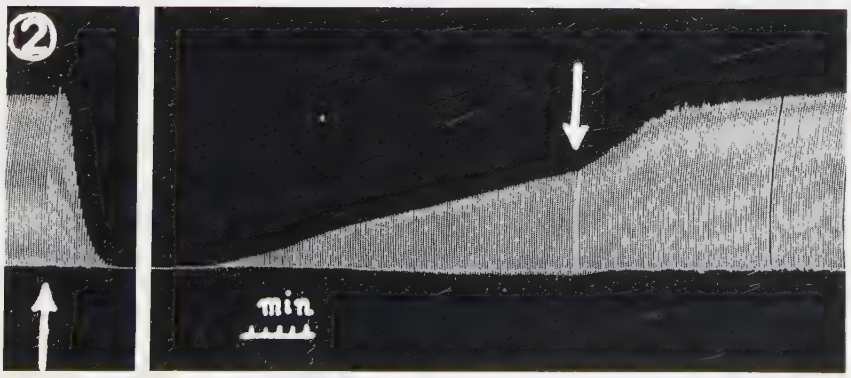
Tracé① ↑ Succinyldicholine ↓4034 HC 0,12 mg/kg

Tracé② ↑ Succinyldicholine ↓4034 HC 0,30 mg/kg

(Exper. n° 60)


TIB
1
2
3
min
SOL

1


2
min

Pour le 4030 HC et le 4033 HC aucune action nette n'a pu être mise en évidence, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre.

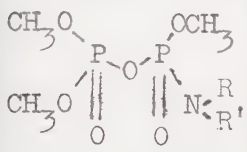
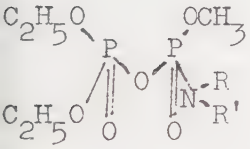
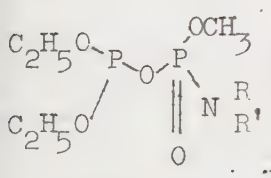
FORMULES	$-N\begin{smallmatrix}R\\R'\end{smallmatrix}$	Numéros conventionnels de l'Institut	ANIMAL	DOSES SUB-MAXIMALES		DOSES MAXIMALES et SUPRAMAXIMALES	
				Action	Doses fract. DL_{50} souris	Action	Doses fract. DL_{50} souris
 (II)	$-N(CH_3)_2$	4030 HC	L			0	1/40 à 2/10
			C			0	1/40 à 4/10
	$-N(C_2H_5)_2$	4031 HC	L	+	2/10	0	4/10
		4032 HC	L	0	1/10	-	3/10
		4033 HC	L			-	1/20
			C	+	1/20	+	1/10
 (III)	$-N(CH_3)_2$	4034 HC	L	+	2/10	-	5/10
			C	0	1/10	+	2/10
	$-N(C_2H_5)_2$	4035 HC	L	+	1/10	-	5/10
		4037 HC	L	0	2/10	-	2,5/10
		4036 HC	L	+	1/10	-	2/10
			C	+	1/10	-	2/10
 (IV)	$-N(CH_3)_2$	4130 HC	L	-	1/20	+	1/10
	$-N(C_2H_5)2$	4131 HC	L	0	1/20	0	1/10
		4132 HC	L	0	3/10	-	6/10
		4133 HC	L	+	1/10	0	2/10

TABLEAU 13

Résultats des expériences sur les modifications apportées à la paralysie par la succinyldicholine (V. p. texte 74)

L = Lapin, C = Chat + = potentialisation

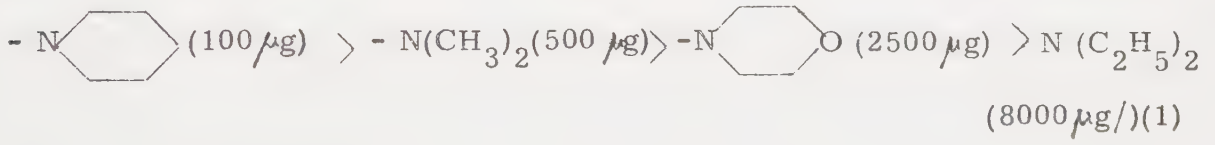
- = antagonisme 0 = pas d'action

CONCLUSION

Nous allons comparer et discuter les résultats expérimentaux obtenus et les confronter avec les données bibliographiques pour en déduire, dans la mesure du possible, le mécanisme d'action de ces produits.

I - SERIE DES ESTERS DIMETHYL DE PHOSPHORAMIDES (I)

Les activités anticholinestérasiques de ces dérivés ont été déterminées par J. CHEYMOL et collaborateurs [16] Le classement par ordre d'activité anticholinestérasique décroissante, en fonction du radical aminé, donne :



1718 HC 1715 HC 1717 HC 1714 HC (2)

Elles sont faibles comparées à celle de l'ésérine. Si en tenant compte de la toxicité on donne à l'ésérine le coefficient 1, on a respectivement pour les produits précédents les indices (1) :

---

(1) Le chiffre exprimant l'activité anticholinestérasique indique la quantité de substance en µg capable de provoquer une inhibition de 50% pour 1,6 ml de sérum humain dilué au 1/20ème (Méthode de WARBURG).

(2) Le 1716 HC ester diméthyl du N-diéthylphosphoramide n'a pas été étudié ici.

0,22 0,13 0,07 0,01

Les propriètés neuromusculaires de ces produits les distinguent très nettement de celles des triesters des pyro- (II et III) et des hypophosphoramides (IV).

Nous avons considéré deux types de produits dont les activités sont opposées : l'un correspondant au 1715 HC, l'autre au 1717 HC et 1718 HC.

A / LE 1715 HC

manifeste chez le Lapin comme chez le Chat :

1 / des propriétés inhibitrices des contractions musculaires. Cette action est précédée par une très courte phase d'hyperexcitabilité musculaire limitée à quelques secousses ; les muscles blancs (tibial antérieur) sont plus sensibles que les muscles rouges (soléaire).

2/ des propriétés antagonistes vis-à-vis des curarimimétiques (d - tubocurarine) et synergiques vis-à-vis des acétylcholinomimétiques (succinyldicholine). Les caractéristiques du 1715 HC comme modificateur de la curarisation permettent de penser que la plaque motrice est le lieu d'action préférentiel de la molécule et autorisent sa classification avec les paralysants neuromusculaires du groupe des acétylcholinomimétiques.

Cependant, la faiblesse de son pouvoir anticholinestérasique laisse supposer que cette propriété ne joue pas à elle seule un rôle déterminant dans le mécanisme d'action du 1715 HC. L'absence de fasciculations généralisées et de manifestations cholinergiques visibles chez l'animal aux doses utilisées vient encore appuyer cette opinion. Il faut probablement envisager un mécanisme par action directe, dont l'étude est en dehors des possibilités de ce travail.

B / LES 1717 HC et 1718 HC

possèdent des propriétés neuromusculaires identiques ; mais le 1718

(1) L'indice comparatif activité anticholinestérasique-toxicité est calculé en effectuant le rapport toxicité en µg/kg/activité anticholinestérasique en µg ; puis, on exprime ce rapport en fonction de celui de l'ésérine choisi comme unité.

HC présente une activité supérieure au 1717 HC.

1 / Ils potentialisent les contractions musculaires, mais cette action, bien que durable, reste toujours modérés en amplitude et ne s'accompagne pas de fasciculations.

2 / Ils potentialisent l'action des curarimimétiques et des acétylcholinomimétiques. Ces propriétés sont incompatibles avec l'existence d'un mécanisme interférant au niveau de la jonction neuromusculaire. Ils agissent sans doute directement sur le nerf ou sur le muscle.

Le contraste entre les propriétés de ces produits et celles du 1715 HC est particulièrement intéressant. Le remplacement du radical aminé $-N(CH_3)_2$ (1715 HC) par (1717 HC) ou (1718 HC) suffit à orienter tout différemment le lieu d'action de la molécule.

II - SERIES DES TRIESTERS DES PYROPHOSPHORAMIDES (II) et (III) ET DES HYPOPHOSPHORAMIDES (IV)

Ces trois séries de dérivés organophosphorés ont des propriétés communes sur les préparations neuromusculaires.

Ce sont très certainement de puissants inhibiteurs des cholinestérases, mais leur activité n'a malheureusement pas pu être déterminée par la méthode de WARBURG, car leur volatilité est telle qu'ils empoisonnent les réactifs dès le début des expériences, quelles que précautions que l'on puisse prendre.

Les caractéristiques de leur activité neuromusculaire s'accordent parfaitement avec celles du T. E. P. P. et avec ce que nous savons sur celles des anticholinestérasiques organophosphorés.

A / INTERPRETATION DES PROPRIETES NEUROMUSCULAIRES DE CES DERIVES

1 / Action sur l'amplitude des contractions musculaires

a / A faibles doses

- si la fréquence de stimulation est basse (6 stimuli/min.) on observe une potentialisation.

- Pour une fréquence tétanique, on observe, au contraire, une inhibition de WEDENSKY

Ces effets s'expliquent aisément, dans le cadre de la théorie classique, par la persistance d'une concentration anormalement élevée d'acétylcholine au niveau de la plaque motrice :

- qui favorise la transmission si la concentration reste faible (basse fréquence),

- qui paralyse la jonction neuromusculaire en prolongeant la dépolarisation si la concentration d'acétylcholine s'élève (fréquence tétanique).

b / A fortes doses (à une DL_{50} Souris)

On observe une paralysie des contractions, même à basse fréquence (6 stimuli/min). Cette inhibition est assez rapidement réversible, alors que la dose d'anticholinestérasique doit être largement suffisante pour bloquer toute activité cholinestérasique. Nous avons déjà vuque la persistance de l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire est insuffisante pour expliquer ce phènomène. Il faut faire intervenir d'autres mécanismes dont l'existence est certaine mais dont la nature n'est pas encore définitivement établie : soit une sensibilisation du récepteur de plaque motrice aux effecteurs (Van Der MEER et MEETER [43] [44] , soit une action directe sur le nerf et le muscle (Mac NAMARA et MURTHA) [45] [47] . Quoi qu'il en soit, l'utilisation de ces fortes doses dépasse le cadre d'une simple étude pharmacologique et serait plutôt du domaine de la toxicologie.

2 / Action anticurare

retrouvée pour la plupart de ces dérivés, elle s'explique parfaitement en faisant intervenir le déplacement compétitif de d - tubocurarine, bloquant les récepteurs de la plaque motrice, par l'acétylcholine.

3 / Action vis-à-vis de la succinyldicholine

La double activité (potentialisation et antagonisme), bien observée pour le 4034 HC, est beaucoup moins nette pour les autres produits.

a / La potentialisation, mise en évidence pour les faibles doses d'organophosphorés, s'explique aisément par l'accumulation d'acétylcholine à la plaque motrice ; ses propriétés dépolarisantes s'ajoutent à celle de la succinyldicholine pour accentuer encore la paralysie.

b / Au contraire, les propriétés antagonistes observées pour les fortes doses d'organophosphorés sont difficilement explicables dans le cadre de la théorie classique et font sans doute appel à des actions directes dont il n'est pas possible de préciser la nature dans le cadre de ce travail.

c / L'augmentation de l'effet inhibiteur de la succinyldicholine, après l'administration d'un dérivé organophosphoré, fait certainement appel à un phénomène de sensibilisation du neurorécepteur identique à celui décrit par COHEN et POSTHUMUS (1955) [26], en particulier pour les sels d'ammonium quaternaire.

B / COMPARAISON AVEC LES PROPRIETES NEUROMUSCULAIRES DU T.E.P.P.

Cette comparaison a permis de classer l'activité de ces dérivés par rapport au T.E.P.P. (Tableau 14).

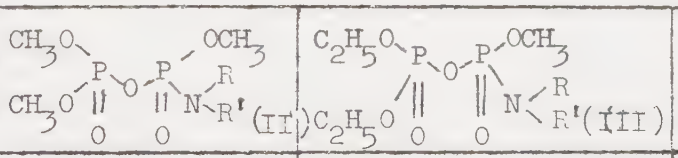
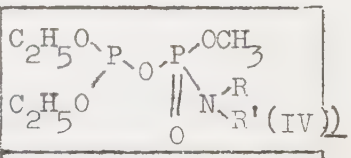
	 (II)		(III)		 (IV)	
	Indices d'action		Indices d'action		Indices d'action	
	Muscul	anticurare	Muscul.	Anticurare	Muscul.	anticurare
- N	25	40	2	4	2	
- N $(CH_3)_2$	8	16	2	4	4	
- N O	$\geqslant$ 1	2	1	4	0,6	
- $N(C_2H_5)_2$	$\geqslant$ 1	0,5	$\geqslant$ 1	1		

TABLEAU 14

Activité musculaire propre (potentialisatrice) et activité anticurare des triesters des pyro (II - et III) et hypophosphoramides (IV) exprimées par rapport à celle du T.E.P.P. (= 1) Le classement est fait par rapport aux radicaux aminés.

Toutes ces substances ont des activités potentialisatrice et anticurare supérieures ou égales à celle du T. E. P. P. Inversement, les toxicités aiguës sont toutes inférieures à celle du T. E. P. P.

Les produits les plus intéressants sont le 4030 HC et le 4033 HC.

Cependant, la technique utilisé présente certaines limites que nous avons déjà signalées (p. 40) et qui ne permettent pas d'attribuer à ces coefficients une valeur absolue. L'utilisation d'une autre préparation telle que la préparation nerf phrénique diaphragme isolée du Rat permettrait une étudé réellement quantitative.

C / RELATIONS ENTRE LA CONSTITUTION CHIMIQUE, L'ACTIVITE NEUROMUSCULAIRE ET LA TOXICITE AIGUE (DL_{50} SOURIS)

1 / Constitution chimique et activité neuromusculaire

a / Rôle du radical aminé

Si on compare activité potentialisatrice et activité anticurare, on constate :

- que le classement de ces activités en fonction des radicaux aminés disubstitués montre une périodicité identique, dans chacune des trois séries :

- que, pour un même produit, les coefficients correspondant à chacune de ces activités sont très voisins l'un de l'autre (Tableau 14) (v.p. 81)

Potentialisation et pouvoir anticurare sont donc directement influencés par la nature du radical aminé et ont des mécanismes d'action identiques.

Nous savons que ce mécanisme est intimement lié au pouvoir anticholinestérasique, qui est lui-même en relation directe avec la nature du radical aminé (radical labile).

On peut donc admettre, pour l'ensemble de ces trois séries de dérivés, un classement du pouvoir anticholinestérasique en fonction des radicaux aminés, identique à celui de l'activité neuromusculaire :

Ceci est en accord avec les résultats obtenus pas J. CHEYMOL et collaborateurs [16] pour la série des phosphoramides (1) correspondants par la mesure directe des activités anticholinestérasiques (v ; p. 77). Cependant, ceci n'est encore qu'une supposition et ne remplace pas la preuve directe qui sera faite par la mesure de l'activité cholinestérasique de ces produits.

b / Rôle des fonctions esters et de l'acide

- La série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II) renferme les substances les plus actives : les 4033 HC et 4030 HC sont, de très loin, supérieurs à tous les autres produits essayés et au T. E. P. P.

- Dans la série des esters monométhyldiéthyl de pyrophosphoramides (III), les propriétés neuromusculaires sont encore très nettes.

- Enfin, dans celle des esters monométhyldiéthyl des hypophosphoramides (IV), on assiste à une dissociation entre l'activité potentialisatrice qui est conservée (sauf pour le 4031 HC portant le radical - N $(C_2H_5)_2$), alors qu'il devient difficile de mettre en évidence l'action anticurare.

Ceci permet donc de penser que le remplacement de deux radicaux méthyls sur trois, par deux radicaux éthyls diminue l'activité des dérivés de l'acide pyrophosphorique et que cette activité décroît encore si on remplace l'acide pyrophosphorique par l'acide hypophosphorique.

2 / Constitution chimique et toxicité aiguë

Nous avons vu qu'il n'existait pas de relation évidente entre les toxicités aiguës et les radicaux aminés disubstitués. Au contraire, l'activité anticholinestérasique est en rapport direct avec le radical aminé ; on peut en

déduire que le blocage des cholinestérases n'est certainement pas le seul facteur qui intervient pour provoquer la mort de l'animal.

3 / Activité neuromusculaire et toxicité aiguë

La série des esters triméthyl de pyrophosphoramides (II) est particulièrement remarquable : toxicité et activité neuromusculaire varient en sens inverse l'une de l'autre. Parmi ces dérivés, les 4033 HC et 4030 HC se montrent non seulement les plus actif, mais encore les moins toxiques. La conjugaison des radicaux aminés - N et $N(CH_3)_2$ avec l'ester triméthyl de l'acide pyrophosphorique réalise une sélectivité d'action particulièrement intéressante.

Le but de ce travail était l'étude des propriétés et du mécanisme d'action neuromusculaire d'un groupe de dérivés organophosphorés. Nous avons, en plus essayé d'interpréter semiquantitativement ces résultats. Mais, pour rester fidèle à probité scientifique avec laquelle l'expérimentateur doit mesurer ses conclusions, on doit rappeler que ces déductions quantitatives reposent sur une base assez fragile, étant donné que :

- les toxicités aiguës ont été déterminées en utilisant des solutions aqueuses de produit dont les coefficients d'hydrolyse ne sont pas connus ;
- l'utilisation d'une préparation neuromusculaire qui, dans le domaine du quantitatif, donnent des résultats aléatoires.

Il faut rappeler enfin que cette étude s'intègre dans une longue série de travaux sur les dérivés organophosphorés. Les questions posées et les inconnues laissées ouvrent la voie à d'autres expérimentations qui compléteront et, au besoin, apporteront les rectifications nécessaires.

Vu, le Président de Thèse

Professeur J. CHEYMOL

Vu, le Doyen de la Faculté

Professeur L. BINET

Vu et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

REFERENCES

1. BARNES, J.M., et DUFF I., -
Brit. J. Pharmacol., 1953, 8, 334-399.

2. BARSTAD, J.A.B. -
Arch. Intern. Pharmacodyn., 1956, 107, 4-20.

3. BARSTAD, J.A.B. -
Arch. Intern. Pharmacodyn., 1956, 107, 21-32.

4. BARSTAD, J.A.B. -
Arch. Intern. Pharmacodyn., 1956, 107, 275-280.

5. BARSTAD, J.A.B. -
Arch. Intern. Pharmacodyn.1960, 128, 142-168

6. BERRY, W.K., EVANS, L. -
J. Physiol., (London), 1951, 115, 46.

7. BOURDELLE, J., BRESSOU, C. -
Baillère Edit. Paris, 1953, 502 p.

8. BOURILLET, F. -
Thèse de Pharmacie, A/ Legrand, édit., Paris, 1959.

9. BÜLBRING, E., BURN, J.H. -
J. Physiol. (London), 1942, 101, 224-235.

10. - BURGEN, A.S.V., KEELE, C.A., SLOME, D. -
J. Pharmacol. Exper. Therap., 1949, 96, 396-409.

11. - BURGEN, A.S.V., HOBBIGER, F. -
Brit. J. Pharmacol., 1951, 6, 593-605.

12. - CHABRIER, P., SELIM, M. - C.R.Ac.
Sc., 1957, 244, 2730-2732.

13. CHASE, H.F., SCHMIDT, J.L., BHATTACHARYA, B.K. -
J. Pharmacol. Exper.Therap.,1947, 91, 236-245.

14. CHEYMOL, G. -
Thèse de Médecine, Paris, 1962, 84 p.

15. CHEYMOL, J., BOISSIER, J.R., LECHAT, P. -
Thérapie, 1961, 16, 326-340.

16. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., BEAUVALLET, M., SELIM, M.
Thérapie, 1961, 16, 28-33.

17. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., MURAD, M. -
Thérapie, 1960, 15, 242-246.

18. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., MURAD, M., SELIM, M. -
Thérapie, 1960, 15, 237-241.

19. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., SELIM, M. -
C.R. Ac. Sc., 1960, 251, 1171-1173.

20. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., SELIM, M. -
C.R. Ac. Sc., 1961, 253, 2075-2077.

21. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., SELIM, M., LEDUC, P. -
C.R. Ac. Sc., 1958, 247, 1014-1016.

22. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., SELIM, M., LEDUC, P. -
C.R. Ac. Sc., 1959, 249, 2573-2575.

23. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., SELIM, M., THUONG, N. -
C.R. Ac. Sc., 1959, 249, 1240-1242.

24. CHEYMOL, J., CHABRIER, P., SELIM, M., THUONG, N.-
C.R. Ac. Sc. , 1960, 251, 550-552.

25. CHOISY, H.G.L. -
Thèse de Médecine, Imp.Vieille Alsace, édit.,
Paris, 1962, 137 p.

26. COHEN, J.A., POSTHUMUS, C.H. -
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 1955, 4, 17-36.

27. COHEN, J.A., POSTHUMUS, C.H. -
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 1957, 5, 385-397

28. COHEN, J.A., WARRINGA M.C.P.J., INDORF, I. -
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 1955, 4 187 - 200

29. COUTEAUX, R. -
Exper. Cell. Res., 1958, suppl. 5, 214-322.

30. DAVISON A.N. -
Biochem. J., 1953, 54, 583-590.

31. DEL CASTILLO J., KATZ, B. -
Progr. Biophys., 1956, 6, 121-170.

32. DELGA, J. -
Actual. Pharmacol., Masson, édit., Paris, 1957., (10ème série), 47-87.

33. DOUGLAS, W.W., MATTHEWS, P.C.B. -
J. Physiol. (London), 1952, 116, 202-218.

34. HOBBIGER, F.,
Brit. J. Pharmacol., 1950, 5, 37-48.

35. HOLMES, R., ROBINS, E.L., -
Brit. J. Pharmacol., 1955, 10, 490-495.

36. HOLMSTEDT B. -
Pharmacol. Rev., 1959, 11, 567-688.

37. HUNT, C.C. -
J. Pharmacol. Exper. Therap., 1947, 91, 77-83.

38. HUNT, C.C., KUFFLER, S.W. -
Pharmacol. Rev., 1950, 2, 96-120.

39. JACOB, J., TAZIEFF-DEPIERRE, F. -
Bovet et Bovet-Nitti, édit., (Elsevier), 1959.

40. KOELLE, G.B., -
J. Pharmacol. and Pharm., 1962, 14, 65-90.

41. KOELLE, G.B., GILMAN, A. - -
Pharmacol. Rev., 1949, 1, 166-216.

42. LEDUC, P. -
Thèse Ingénieur Docteur, Paris, 1960, 112 p.

43. MEER (VanDer) C., MEETER, E. -
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.
1956, 4, 454-471.

44. MEER (Van Der) C., MEETER, E. -
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 1956, 4, 472-481.

45. MURTHA, E.F., Mc NAMARA, B.P., EDBERG, L.J., BERGNER, A.D. WILLS, J.H. -
J. Pharmacol. Exper. Therap., 1955, 115, 291-299.

46. NACHMANSOHN, D., WILSON, I.R., -
Advanc. Enzymol., 1951, 12, 259-339.

47. NAMARA (MC B.P.), MURTHA, E.F., BERGNER, A.D., ROBINSON E.M., BENDER, C.W., WILLS, J.H. -
J. Pharmacol. Exper. Therap. 1954, 110, 232-240.

48. RIKER., W.F. -
Pharmacol. Rev., 1953, 5, 1-86.

49. SMITH, C.M., COHEN, H.C., PELIKAN, E.W., UNNA, K.R. -
J. Pharmacol. Therap., 1952, 105, 391-399.

50. THESLEFF S. -
Nature, 1955, 175, 594.

51. THESLEFF S. -
Acta Physiol. Scand., 1955, 34, 376.

52. THUONG - N.
Thèse Ingénieur Docteur, Paris, 1960, 111 p.

53. - WILSON, I.B., GINSBURG, S. -
Biochem. Biophys. Acta, 1955, 18, 168-170.

oOo